

PCT/EP2004/051068  
10/560159

PCT/EP2004/051068

IAP13 Rec'd PCT/PTO 09 DEC 2005



# Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

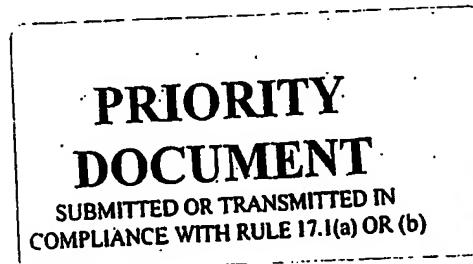
Ufficio G2



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per  
Invenzione Industriale N. MI2003 A 001156 del 09.06.2003

REC'D 02 AUG 2004	
WIPO	PCT

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.



Roma, li.....

28 GIU 2003

IL FUNZIONARIO

Giampietro Carlotto

Giampietro Carlotto

BEST AVAILABLE COPY



## **RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE**

**NUMERO DOMANDA**

REF-1A

DATA DI REROSER

NUOVO BREVETTO

DATA DI RISOGNO

M 2003/00 1156

NEVER

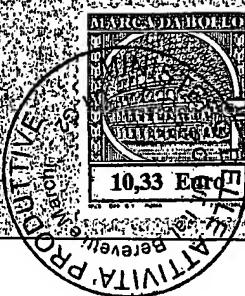
0906203 / 560137

2020 TITLE

**Mutazioni nel gene SLC40A1 associate ad alterata omeostasi del ferro**

## L · RIASSUNTO

La presente invenzione riguarda mutazioni nel gene **SLC40A1**, codificante per la ferroporina-1, associate ad alterata omeostasi del ferro o ad emocromatosi ereditaria non dipendente dal gene HFE e a metodi per la diagnosi di tali patologie ereditarie basati sull'identificazione di tali mutazioni.



M. DISEGNO

10/560157

3946PTIT

Notarbartolo & Gervasi S.p.A.

IAP13 Rec di Pavia 03 DEC 2005

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo :

"Mutazioni nel gene SLC40A1 associate ad alterata omeostasi del ferro"

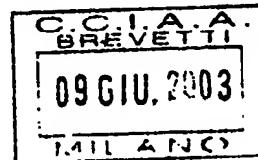
a nome di: PIETRANGELO ANTONELLO

MI 2003 A 001156

residente in : MODENA

Inventore designato : PIETRANGELO Antonello

\* \* \* \* \*



### CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda nuove mutazioni nel gene codificante la Ferroportina 1 associate ad una nuova forma di malattia ereditaria da accumulo di ferro e l'identificazione di tali mutazioni quale metodo diagnostico per le emocromatosi ereditarie.

### STATO DELL'ARTE

L'emocromatosi è una patologia ereditaria caratterizzata da un accumulo eccessivo di ferro nell'organismo, il quale porta con il tempo a lesioni a livello di diversi organi e tessuti, in particolare di fegato, miocardio, pancreas, rene, milza, gonadi e cute. L'emocromatosi idiopatica è la malattia ereditaria più diffusa nella popolazione occidentale (incidenza 1:300) ed è caratterizzata da una trasmissione recessiva. Questo tipo di emocromatosi è stata dapprima associata a mutazioni del gene HFE (Hereditary hemochromatosis descritta in Feder et al. Nat. Genet. 1996, 13:399-408). Studi più recenti hanno dapprima ipotizzato e quindi dimostrato che nelle popolazioni sud-europee in particolare, altri geni oltre al HFE potessero essere responsabili dell'emocromatosi idiopatica (Piperno e altri, Gastroenterology 1998, 114: 996-1002 e Borot e altri, Immunogenetics 1997, 45:320-324).

Alcune mutazioni nel gene della ferroportina recentemente denominato SLC40A1, e noto in precedenza anche come SLC11A3 o IREG-1 o MTP-1, sono infatti già state identificate sia dagli stessi autori della presente invenzione che da altri come descritto ad esempio in: Montosi et al., J. Clin. Invest., 2001, 108:619 ed in WO 02/033119; Devalia V et al., Blood, 2002, 100:695; Cazzola et al., British Journal of Hematology 2002, 119:539; Wallace et al., Blood, 2002, 100:692; Njajou Nat. Genet. 2001, 28:213

L'identificazione del maggior numero di modificazioni genetiche responsabili di emocromatosi ereditaria o di patologie legate ad una alterata omeostasi del ferro è di grande importanza sia diagnostica che terapeutica. Infatti, a tutt'oggi la diagnosi dell'emocromatosi avviene tardivamente ed è basata sulla sintomatologia clinica che si sviluppa in seguito a lesioni tessutali spesso irreversibili. Inoltre, la diagnosi di tale patologia è resa difficoltosa dal fatto che i suoi sintomi sono spesso simili a quelli di altre patologie caratterizzate da alterata omeostasi del ferro.

Lo sviluppo di metodi di screening genetico per la diagnosi precoce, in fase presintomatica, dell'emocromatosi ereditaria permetterebbero di intervenire tempestivamente con la flebotomia prevenendo in tal modo danni ad organi e tessuti.

Inoltre, l'identificazione delle alterazioni genetiche associate all'emocromatosi ereditaria e la comprensione del ruolo che esse svolgono nello sviluppo della patologia sono di estrema importanza per la messa a punto di nuovi e migliori strategie terapeutiche.

## SOMMARIO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda polinucleotidi isolati codificanti per una ferroportina 1 mutata in almeno una delle posizioni corrispondenti ai seguenti amminoacidi: posizione 80, posizione 174 o in posizione 248 della seq IDN2. L'identificazione di tali mutazioni sulla proteina o sugli acidi nucleici per essa codificanti è di estrema utilità per la diagnosi e la terapia di emocromatosi non HFE dipendenti, della siderosi Bantu o emocromatosi africana o della predisposizione a tali malattie.

L'invenzione riguarda quindi inoltre i metodi per la diagnosi molecolare basati sull'uso di oligonucleotidi derivati da tali sequenze o sugli anticorpi specifici per tali mutazioni.

L'invenzione comprende inoltre anche i kit diagnostici per l'identificazione di tali polimorfismi.

## DESCRIZIONE DELLE FIGURE

**Figura 1: Mutazione G80. Risultato dell'analisi diagnostica dei membri della famiglia sani o affetti da emocromatosi.**

Nel pannello A è rappresentata la relazione tra gli individui analizzati (*pedigree*) nella famiglia recante la mutazione G80. I soggetti affetti da emocromatosi sono indicati in nero, mentre quelli sani in bianco. I cerchi indicano i soggetti di sesso femminile mentre i quadrati quelli di sesso maschile. Nel pannello B è visualizzato l'elettroferogramma fornito dal sequenziatore automatico sul frammento di DNA amplificato secondo l'invenzione da un controllo (che non porta il polimorfismo) e da un individuo malato (che porta il polimorfismo). Nel pannello C è rappresentato il profilo di restrizione ottenuto in seguito a digestione con



TspR1 del DNA genomico amplificato da ciascun individuo con i primers di sequenza IDN13 e IDN14. Come indicato nel pannello B nel caso di soggetti sani, che presentano solo la sequenza *wild type*, in seguito a digestione con TspR1 il DNA amplificato, di 421 paia di basi, non viene digerito. Nei soggetti affetti dalla patologia, eterozigoti per la mutazione, il DNA amplificato viene digerito in una banda di 421 paia di basi (allele normale) e due bande di 238 e 183 paia di basi (quest'ultima non visibile in Figura 2b). (+/+): Soggetti omozigoti per la ferroportina *wild type*, (+/-): soggetti eterozigoti per la mutazione.

**Figura 2. Mutazione N174. Risultato dell'analisi diagnostica dei membri della famiglia sani o affetti da emocromatosi.**

Nel pannello A è rappresentata la relazione tra gli individui analizzati (*pedigree*) nella famiglia recante la mutazione N174. I soggetti affetti da emocromatosi sono indicati in nero, mentre quelli sani in bianco. I cerchi indicano i soggetti di sesso femminile mentre i quadrati quelli di sesso maschile. Nel pannello B è visualizzato l'elettroferogramma fornito dal sequenziatore automatico sul frammento di DNA amplificato secondo l'invenzione da un controllo (che non porta il polimorfismo) e da un individuo malato (che porta il polimorfismo).

Nel pannello C sono rappresentati i profili di restrizione ottenuti in seguito a digestione con Bsml del DNA amplificato da individui sani o affetti dalla patologia con i primers di sequenza IDN19 e IDN20. Nel caso di soggetti sani che presentano solo la sequenza *wild type*, in seguito a digestione con Bsml il DNA amplificato, di 425 paia di basi, viene digerito in due frammenti di 342 e 83 paia di basi. Nei soggetti affetti dalla patologia il

polimorfismo determina perdita della sequenza di riconoscimento per l'enzima di restrizione e quindi il DNA amplificato non viene digerito. Poiché i soggetti portatori della patologia sono eterozigoti per la mutazione, in seguito a digestione con Bsml si otterranno tre bande: una banda di 425 paia di basi (allele mutato) e due bande di 342 e 83 paia di basi (allele wild-type).

(+/+): Soggetti omozigoti per la ferroportina wild type, (+/-): soggetti eterozigoti per la mutazione.

**Figura 3. Mutazione Q248. Risultato dell'analisi diagnostica dei membri della famiglia sani o affetti da siderosi Bantu.**

Nel pannello A è riportata la sequenza parziale dell'esone 6 in cui è stata trovata la mutazione in soggetti con siderosi africana e neri americani. La Figura 3b indica rappresenta il profilo di restrizione ottenuto in seguito a digestione con Pvull del DNA amplificato da vari individui con i primers di sequenza IDN19 e IDN20. Come indicato nella Figura 3b, nel caso di soggetti sani che presentano solo la sequenza *wild type*, il DNA amplificato di 425 paia di basi, viene digerito con l'enzima di restrizione Pvull. La mutazione abolisce il sito di riconoscimento dell'enzima e in un soggetto eterozigote un allele viene digerito e l'altro no così che si ottengono tre bande: una banda di 425 paia di basi (allele mutato) e due bande di 302 e 123 paia di basi (allele wild-type).

(+/+): Soggetti omozigoti per la ferroportina wild type, (+/-): soggetti eterozigoti per la mutazione.

**DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE**

Gli autori della presente invenzione hanno identificato nuove mutazioni

localizzate nel gene SLC40A1 (Solute Carrier Family) codificante per la ferroportina 1 (o IREG1 o MTP1), denominato in precedenza anche SLC11A3, geneticamente legate alla presenza di emocromatosi ereditaria o di una alterata omeostasi del ferro non dipendente dal gene HFE (Hereditary Hemochromatosis).

Le mutazioni descritte nella presente invenzione sono state localizzate nel gene SLC40A1 codificante per la ferroportina, in corrispondenza dei codoni per gli aminoacidi G80, N174 e Q248 della ferroportina 1 dove tale numerazione è riferita alla sequenza wild type identificata con numero di accesso NM\_014585 (GenBank) e fornita nel listato sequenze allegato con il numero identificativo 1 (seqIDN1, wild type). A livello genomico, le mutazioni localizzano rispettivamente nel 3° esone (mutazione G80), e nel 6° esone (mutazione N174 e mutazione Q248) del gene SLC40A1.

Tali mutazioni determinano sostituzioni amminoacidiche nella corrispondente proteina, la cui espressione in forma mutata determina un accumulo di ferro anomalo in individui portatori. Da un punto di vista funzionale infatti, la ferroportina riveste un ruolo chiave in almeno due aspetti diversi ma correlati, dell'omeostasi del ferro: negli enterociti la ferroportina determina l'assorbimento del ferro introdotto con la dieta, mentre nelle cellule reticolendoteliali, in particolare nei macrofagi, essa determina il rilascio del ferro dai depositi (store) intracellulari. Tali nuove mutazioni sono responsabili di emocromatosi e caratterizzate da tratti clinici almeno parzialmente simili da quelli già descritti in Pietrangelo et al. New England Journal of Medicine 1999, 341 (10): 725-732, dovuti alla

mutazione A77D descritta in WO02/033119.

L'invenzione riguarda quindi in un suo primo aspetto polinucleotidi polimorfici rispetto alla sequenza SLC40A1, codificanti per forme della ferroportina 1 mutate rispetto al wild type e riguardanti almeno uno dei seguenti polimorfismi:

- polimorfismo del nucleotide corrispondente al nucleotide 238 della sequenza IDN1, preferibilmente relativo alla sostituzione di una guanina con una adenosina (G A), che determina la sostituzione dell'aminoacido 80 con un aminoacido diverso da glicina e preferibilmente con serina (G80S) nella proteina codificata: il cDNA derivato da tale gene polimorfico ha preferibilmente sequenza IDN3;
- polimorfismo del nucleotide corrispondente al nucleotide 521 della sequenza IDN1, preferibilmente relativo alla sostituzione di una adenina con una timina (A T), che determina la sostituzione dell'aminoacido 174 con un aminoacido diverso da asparagina preferibilmente con isoleucina (N174I) nella proteina codificata: il cDNA derivato da tale gene polimorfico ha preferibilmente sequenza IDN5;
- Polimorfismo del nucleotide corrispondente al nucleotide 744 della sequenza IDN1, preferibilmente relativo alla sostituzione di una guanina con timina (G T), che determina la sostituzione dell'aminoacido 248 con un aminoacido diverso da glutammina e preferibilmente con istidina (Q248H) nella proteina codificata: il cDNA derivato da tale gene polimorfico ha preferibilmente sequenza IDN7;

o i loro frammenti oligonucleotidici aventi lunghezza di almeno 10 basi.



Sulla base della numerazione del cDNA wild type corrispondente al numero di accesso GenBank N° NM\_0145585, sequenza riportata parzialmente in seq IDN1, i polinucleotidi isolati secondo l'invenzione comprendono quindi almeno una delle seguenti sostituzioni: guanina in posizione 552, preferibilmente con adenina, adenina in posizione 835 preferibilmente con timina, guanina in posizione 1058, preferibilmente con timina: con tale numerazione ci si intende riferire alla numerazione della sequenza di cui sopra in GenBank.

Gli oligonucleotidi dell'invenzione possono essere sintetizzati per via chimica o enzimatica, oppure mediante digestione di polinucleotidi isolati con enzimi di restrizione.

Una realizzazione preferita di tali polinucleotidi è rappresentata dalle sequenze IDN3, IDN5, e IDN7, o loro frammenti aventi una lunghezza di almeno 10 nt e comprendenti almeno una delle sostituzioni polimorfiche sopra identificate, dove tali sequenze corrispondono al cDNA codificante per ciascuna delle forme di ferroportina 1 mutata sopra descritte.

Quando il polinucleotide è DNA esso può essere a singola oppure a doppia elica, preferibilmente l'oligonucleotide è a singola elica. I poli- o gli oligonucleotidi secondo l'invenzione possono comprendere basi modificate, quali ad esempio i nucleotidi tioderivati.

L'invenzione comprende inoltre i polinucleotidi e gli oligonucleotidi con sequenza complementare ai polinucleotidi e agli oligonucleotidi dell'invenzione e caratterizzati dal fatto di comprendere il nucleotide complementare ad almeno 1 dei nucleotidi polimorfici sopra descritti.

Preferibilmente essi sono complementari alla seq IDN1, 3 e 5 o loro

frammenti, nonchè agli oligonucleotidi di almeno 10 basi comprendenti almeno uno dei polimorfismi: in particolare quindi comprendenti il nucleotide complementare al polimorfismo del nucleotide 238 della sequenza IDN1, oppure quello complementare al polimorfismo del nucleotide 521 della sequenza IDN1, oppure quello complementare al polimorfismo del nucleotide 744 della sequenza IDN1.

I polinucleotidi ed i nucleotidi complementari alla sequenza della ferroportina di cui sopra, possono essere utilizzate per regolare in modo specifico l'espressione dei trascritti corrispondenti o possono essere utilizzati come sonde specifiche per rilevare la presenza di almeno uno dei polimorfismi sopra descritti.

Gli oligonucleotidi ed i polinucleotidi dell'invenzione possono essere anche solo parzialmente identici o parzialmente complementari alle sequenze della ferroportina identificate con le seq IDN3, 5, 7 o loro frammenti e comprendere quindi regioni di non omologia o di non identità. La regione di complementarietà o di omologia con la ferroportina o con il suo complementare è in questo caso di almeno 10 nucleotidi.

In particolare per gli oligonucleotidi è indispensabile che tali ulteriori nucleotidi aggiunti preferibilmente al 5' o al 3' non alterino la specificità nel rivelare i polimorfismi.

Sequenze complementari tra di loro sono in grado di ibridizzare in condizioni stringenti e quindi in modo specifico le une alle altre. Pertanto i polinucleotidi o gli oligonucleotidi complementari dell'invenzione sono caratterizzati dal fatto di ibridizzare specificamente ai polinucleotidi o alle sequenze che portano le mutazioni nei siti polimorfici in particolare alle

sequenze IDN 3, 5 o 7 o ai loro frammenti od oligonucleotidi.

Sono inoltre compresi nella presente invenzione gli oligonucleotidi che portano all'amplificazione di regioni di DNA genomico o di cDNA comprendenti le mutazioni descritte, di cui una realizzazione preferita è rappresentata dagli oligonucleotidi di sequenza IDN 9-22, che amplificano a coppie il DNA genomico nelle regioni esoniche da 1 a 7 (ad es. i primer di sequenza IDN9 e 10 amplificano l'esone 1, seqIDN11 e 12 l'esone 2 e così via come descritto nella parte sperimentale in maggior dettaglio). Particolarmente preferiti sono la coppia di oligonucleotidi di sequenza IDN13 e 14 che amplifica il DNA genomico a livello dell'esone 3, comprendente il polimorfismo corrispondente al nucleotide 238 della seqIDN1, e la coppia IDN19 e 20 che amplifica la regione esonica dell'esone 6, comprendente i polimorfismi corrispondenti ai nucleotidi 521 e 744 della seqIDN1.

Per "frammento nucleotidico" o polinucleotide secondo la presente invenzione si intende un acido nucleico con una sequenza parziale rispetto alla seqIDN 3, 5 e 7, avente una lunghezza superiore a 50 nucleotidi e comprendente almeno una delle mutazioni o polimorfismi descritti.

Per "oligonucleotide" secondo la presente invenzione si intende un acido nucleico con una sequenza parziale rispetto alle seqIDN3, 5 e 7 ed una lunghezza minima di 10 paia di basi.

Secondo un ulteriore ed importante aspetto l'invenzione riguarda quindi inoltre una proteina, la ferroportina 1, in forma sostanzialmente isolata e purificata, avente sequenza aminoacidica mutata rispetto alla sequenza

wild type rispettivamente in posizione corrispondente all'amminoacido glicina 80, oppure in posizione corrispondente all'amminoacido asparagina 174, oppure in posizione corrispondente all'amminoacido glutammina 248, rispetto alla sequenza aminoacidica dedotta dal cDNA corrispondente al n° di accesso NM\_014585 (GenBank).

Le posizioni numeriche dell'aminoacido sulla proteina hanno come unico scopo di identificarlo in maniera univoca potendo variare a causa ad esempio della presenza di ulteriori mutazioni specie-specifiche o a causa della presenza di inserzioni o delezioni nelle regioni codificant per sequenze a monte di detto aminoacido.

La mutazione G80S determina il cambio di glicina un aminoacido a polarità intermedia del P.M. di 75 in serina, un aminoacido idrofilico di P.M. 105. La mutazione N174I determina il cambio di asparagina, un aminoacido idrofilico non carico di P.M. 132 a isoleucina un aminoacido idrofobico, non carico di P.M. 131. La sostituzione dell'aminoacido 174 è di importanza cruciale per la proteina poiché è un sito di glicosilazione.

Inoltre la mutazione in posizione corrispondente all'aminoacido 248 della ferroportina 1 è indicatore della forma africana di emocromatosi ereditaria, denominata siderosi africana, geograficamente localizzata nelle regioni Sud-sahariane e caratterizzata da accumulo di ferro prevalentemente nel sistema reticoloendoteliale con aumento della ferritinemia precoce e non sempre accompagnato da una totale saturazione della transferrina circolante. Questi tratti sono sorprendentemente simili alla malattia della ferroportina descritta (Pietrangelo et al. New England Journal of Medicine 1999, 341 (10): 725-

732).

Alcuni dei tratti clinici associati con le mutazioni sopra descritte sono qui di seguito indicati:

- i) nei portatori della mutazione G80S: aumenta la ferritinemia tra 1000 e 2000 ng/ml nei soggetti maschi non trattati; mentre nelle femmine la ferritina usualmente non supera i 700 ng/ml anche in donne anziane, in epoca postmenopausa;
- ii) nei portatori della mutazione N174I: è osservabile un notevole aumento della ferritinemia che supera i 4000 ng/ml anche nelle femmine. E' verosimile che la mutazione abbia un effetto strutturale e funzionale sulla proteina più severo delle altre mutazioni;
- iii) nei portatori della mutazione Q248H: è osservabile in soggetti di colore americani o africani. La mutazione ha un effetto aggravante su una condizione preesistente di eccesso di ferro. Nei pazienti americani trovati, affetti da uno stato portatore di talassemia, provoca un fenotipo più grave, con iperferritinemia e deposito di ferro nelle cellule reticolendoendoteliali (macrofagiche) del midollo e del fegato -quadro tipico della malattia descritta dagli stessi autori della presente invenzione nel 1999 (Pietrangelo et al. 1999) pur senza che i pazienti abbiano subito trasfusioni di sague (pratica che può portare ad accumulo di ferro nelle cellule macrofagiche). Nei pazienti africani affetti da siderosi Bantu (legata cioè all'accumulo eccessivo di birra preparata in recipienti di ferro) è responsabile di una iperferritinemia più elevata dei soggetti che non hanno la mutazione ma consumano livelli simili di alcool. Paradossalmente, la presenza della mutazione determina anche una



condizione di anemia, con calo altamente significativo dell'emoglobina.

Inoltre, la mutazione è un marcatore della popolazione nera di origine africana che non risulta presente in alcuno dei donatori sani di origine caucasica, come dimostrato specularmente dal fatto che su 100 cromosomi di soggetti africani apparentemente normali, 6 di questi cromosomi presentavano la mutazione; analogamente sul DNA di 100 donatori anonimi di colore americani, la mutazione è stata ritrovata in 4 soggetti. L'analisi di questi soggetti apparentemente sani ha mostrato una tendenza della ferritinemia a valori più elevati ed una emoglobinemia significativamente più bassa rispetto a quelli senza mutazione. La mutazione quindi in associazione ad altri fattori (ad es. consumo alcolico, talassemia) dà un fenotipo più severo. Inoltre, nella popolazione nera africana ed americana potrebbe contribuire a determinare i livelli di emoglobina tendenzialmente più bassi, e di ferritinemia, tendenzialmente più alti, come descritto maggiormente in dettaglio nella parte sperimentale di commento alla tabella 1.

E' tuttavia da tener presente che i valori di emoglobina o di ferritinemia di per sé non costituiscono indicazione diagnostica dell'emocromatosi non dipendente dal gene HFE se non in associazione alla presenza di almeno una delle mutazioni descritte nell'invenzione. Tali valori possono quindi scostarsi da quanto riportato sopra, anche in dipendenza da altri fattori quali l'età del soggetto, o il momento in cui viene effettuata la diagnosi, etc.

Secondo un ulteriore aspetto l'invenzione comprende peptidi o polipeptidi di lunghezza superiore a 5 aminoacidi aventi sequenza

parziale corrispondente a quella della proteina ferroportina 1 e caratterizzati dal fatto di comprendere le mutazioni nelle posizioni amminoacidiche corrispondenti alla glicina in posizione 80, all'asparagina in posizione 174 o alla glutammina in posizione 248. Tali peptidi o polipeptidi sono ottenuti mediante sintesi chimica oppure con metodi ricombinanti. Preferibilmente i polipeptidi comprendenti almeno una delle mutazioni sopra identificate e di lunghezza superiore a 100 aminoacidi, sono ottenuti mediante le tecniche del DNA ricombinante, mentre peptidi comprendenti almeno una delle mutazioni sopra identificate, di lunghezza inferiore a 100 aminoacidi sono preferibilmente ottenuti mediante sintesi chimica.

Secondo la predizione di struttura presentata in Davalia et al. le mutazioni G80 e N174 sono localizzate nei dominii extracellulari della ferroportina, mentre la mutazione Q248 è la prima mutazione che mappa in un dominio intracellulare rappresentato, secondo questa predizione, dagli aminoacidi 221-306. Il dominio comprendente tale mutazione rappresenta quindi un ulteriore oggetto dell'invenzione, in quanto per la prima volta sorprendentemente legato a polimorfismi che determinano tratti clinici simili a quelli della emocromatosi ereditaria non dipendente dal gene HFE ed in grado di determinare un fenotipo più severo in associazione ad altri fattori (ad es. consumo alcolico, talassemia). Ovviamente l'alterazione della funzionalità della ferroportina in seguito alla mutazione Q248 è indipendente dall'assegnazione ad un dominio intra o extra-cellulare del modello di predizione di struttura secondaria o terziaria ed è quindi indipendente dalla validità di tal modello di

predizione.

In un suo ulteriore aspetto l'invenzione riguarda peptidi aventi sequenza derivata dalla seq IDN 2 (o 4 o 6 o 8), con una lunghezza di almeno 5 aminoacidi e comprendenti l'aminoacido corrispondente alla posizione 80, 174 e 248 di SEQ ID NO: 2 (o 4 o 6 o 8) e gli aminoacidi immediatamente a valle e/o a monte di questi. La lunghezza e la sequenza di tali peptidi sono scelti in base a criteri noti al tecnico del ramo a seconda dell'applicazione che se ne desidera fare. Realizzazione preferita di tali peptidi sono i peptidi corrispondenti a: Ile-Ile-X-Asp-Trp (G80) dove X è diverso da glicina ed è preferibilmente serina; Asn-Met-X-Ala-Thr, dove X è diverso da asparagina ed è preferibilmente isoleucina; Leu-Lys-X-Leu-Asn, dove X è diverso da glutammmina ed è preferibilmente istidina; sono inoltre compresi nella presente invenzione i polipeptidi comprendenti tali peptidi. Essi risultano utili ad esempio per identificare la presenza di una delle mutazioni descritte mediante saggi di competizione, in un materiale cellulare o proteico, quale ad esempio un estratto cellulare, oppure in immunoassaggi diagnostici. Tali peptidi possono comprendere all'N o al C-terminale aminoacidi non derivati dalla sequenza della ferroportina ed aventi funzione diversa, ad esempio peptidi "tag" per facilitare la purificazione.

Per convenzione ed ai fini della presente invenzione, con il termine frammento della proteina ferroportina o polipeptide secondo l'invenzione, si intende una molecola avente sequenza parziale rispetto alla proteina ferroportina 1 mutata come descritto e comprendente almeno una di dette mutazioni ed avente una lunghezza superiore a 50 aminoacidi



Con il termine peptide secondo l'invenzione si intende una molecola avente come sequenza una sequenza parziale della proteina ferroportina 1 mutata, e comprendente almeno una di dette mutazioni ed avente una lunghezza di almeno 4 aminoacidi, ma inferiore o uguale a 50 aminoacidi.

Rientrano inoltre nella portata della presente invenzione anticorpi in grado di riconoscere in modo specifico, rispetto alla proteina wild type almeno una delle mutazioni G80, N174 e Q248. Tali anticorpi specifici sono di utilità diagnostica in quanto la presenza di una ferroportina recante almeno una delle mutazioni descritte costituisce indicatore diagnostico anche precoce di una alterata omeostasi del ferro su base ereditaria.

Data la alta incidenza dell'emocromatosi ereditaria non dipendente dal gene HFE (64% delle forme di emocromatosi italiana) e nel resto del mondo dove sono stati riportati casi in etnie caucasiche, asiatiche ed altre, e la sua costante progressione, i polinucleotidi, gli oligonucleotidi, i polipeptidi o i peptidi, le forme di ferroportina mutata comprendenti le mutazioni descritte, nonché gli anticorpi specifici per le mutazioni identificate nella proteina, hanno una chiara applicazione in campo farmaceutico sia nel settore diagnostico che in quello terapeutico.

In campo diagnostico i prodotti nucleotidici e polipeptidici dell'invenzione sono importanti per la diagnosi dell'emocromatosi ereditaria non legata al gene HFE, preferibilmente per la diagnosi dell'emocromatosi africana e nord-americana, per la diagnosi differenziale delle iperferritinemie ereditarie o congenite, o per la diagnosi di anemie da causa ignota in

giovani donne o delle iperferritinemie da causa ignota in bambini ed adulti.

In particolare nell'emocromatosi Bantu o siderosi africana la diagnosi del polimorfismo Q248 risulta essere particolarmente utile per rivelare la base genetica di un fenotipo più severo o del rischio di sviluppare un tale fenotipo in associazione con altri fattori (ad es. consumo alcolico o la talassemia). La mutazione Q248 risulta inoltre di particolare importanza per rivelare la base genetica di una alterata omeostasi del ferro che nei portatori di tale polimorfismo è associata con livelli normali di ferritinemia ma con livelli alterati di emoglobinemia.

La diagnosi molecolare *in vitro*, basata sulla rivelazione delle mutazioni del DNA o della proteina descritte nella presente invenzione, e resa possibile dai metodi e dai reagenti descritti nella presente invenzione, consente la diagnosi precoce dell'emocromatosi ereditaria. La diagnosi precoce è indispensabile per una patologia che rimane in genere asintomatica fino ai 30 anni, e viene spesso diagnosticata solo in seguito agli effetti secondari del deposito di ferro a livello degli organi interessati (polmoni, fegato, articolazioni, pancreas) nel momento in cui la loro funzionalità è già compromessa in modo irreparabile.

Gli oligonucleotidi e i polinucleotidi comprendenti il polimorfismo responsabile della mutazione Q248 sono inoltre di utilità come marcatori genetici per la popolazione nera di origine africana e sono utilizzati in studio del legame (linkage) genetico di malattie i cui geni mappano sullo stesso cromosoma.

Gli acidi nucleici dell'invenzione sono di utilità in campo terapeutico, in

particolare nella terapia genica sostitutiva, dove mediante ricombinazione omologa con sequenze wild type e/o per la terapia cellulare rappresentano il bersaglio di tali sequenze. Infatti, poiché la presenza in un individuo di un gene recante almeno una delle mutazioni dell'invenzione e del prodotto (ferroportina 1 mutata) da esso codificata è correlata con l'insorgenza di emocromatosi ereditaria, risulta molto importante disporre di mezzi per bloccare l'espressione del gene od inattivare la proteina. L'invenzione si riferisce quindi a composizioni farmaceutiche comprendenti detti oligonucleotidi, anticorpi o peptidi miscelati con eccipienti farmaceuticamente accettabili.

In una delle applicazioni più comuni gli acidi nucleici dell'invenzione, preferibilmente gli oligonucleotidi di lunghezza inferiore a 50bp, preferibilmente di almeno 40 bp o ancor più preferibilmente di lunghezza compresa tra 8-25, o 8-15 nucleotidi sono utilizzati per verificare la presenza in un campione biologico dei polimorfismi su indicati.

Pertanto rientra nell'ambito della presente invenzione l'uso terapeutico di dei polinucleotidi ed oligonucleotidi dell'invenzione. Tipicamente detti oligonucleotidi comprendono i polimorfismi sopra descritti o hanno sequenza complementare alla regione comprendente detti polimorfismi e sono pertanto oligonucleotidi o polinucleotidi allele-specifici.

Preferibilmente gli oligonucleotidi o gli acidi nucleici dell'invenzione comprendono i seguenti decameri o le sequenze ad essi complementari:

5' ATCAGTGACT 3' (seqID 23) comprendente il polimorfismo, sottolineato e responsabile della mutazione G80S, 5' GATGATTGCC 3' (seqIDN 24) comprendente il polimorfismo sottolineato e responsabile

della mutazione N174I, 5' GAAACACTG 3' (seqIDN 25) comprendente il polimorfismo sottolineato e responsabile della mutazione Q248H. Essi possono pertanto comprendere nucleotidi addizionali al 5' o al 3' quando questi non ne alterino la specificità di riconoscimento, ad esempio per ibridazione ad una sequenza di ferroportina, per i polimorfismi la cui valenza terapeutica e diagnostica sono qui descritti quale oggetto della presente invenzione.

I polinucleotidi dell'invenzione, in particolare le sequenze IDN 3, 5, 7 o i loro frammenti, possono essere inoltre utilizzate per la produzione di molecole di ferroportina 1 ricombinante o di proteine chimeriche o di forme tronche della proteina comprendenti almeno uno tra gli amminoacidi mutati in posizione G80, N174, Q248. Essi sono inseriti in vettori d'espressione ed utilizzati per la trasformazione di cellule procariote o eucariote secondo tecniche ben note nell'arte quali ad, esempio, trasfezione, trasformazione, infezione o iniezione intranucleare. Vettori adatti a questo scopo includono, ad esempio, plasmidi, vettori di origine virale e cromosomi artificiali di lievito o di mammifero.

Secondo una ulteriore applicazione, l'invenzione si riferisce pertanto a un vettore ricombinante comprendente un acido nucleico o un frammento di DNA secondo l'invenzione così come a cellule eucariote o procariote trasformate con detto vettore.

L'esperto del ramo è in grado di scegliere di volta in volta frammenti e oligonucleotidi aventi sequenza e lunghezza adatte all'utilizzo che se ne desidera fare. Ad esempio, qualora detti frammenti o oligonucleotidi vengano utilizzati per l'individuazione della mutazione dell'invenzione

tramite tecniche di ibridazione essi devono avere lunghezza e sequenza tale da essere in grado di ibridarsi in modo specifico, in condizioni stringenti, ad una sequenza dell'acido nucleico comprendente il codone mutato.

Le sonde oligonucleotidiche allele-specifiche hanno lunghezza superiore a 10 nucleotidi, preferibilmente compresa tra 15 e 50 nucleotidi e ancor più preferibilmente non superiore a 35 nt, preferibilmente compresa tra 15 e 30 nucleotidi. La scelta della sequenza di tali sonde è alla portata del tecnico del ramo che le seleziona sulla sequenza intera anche mediante software conosciuto ed in dipendenza del saggio in verranno utilizzate. Preferibilmente esse comprendono almeno uno tra gli oligonucleotidi di sequenza IDN23, 24 o 25 i quali sono caratterizzati dal fatto di comprendere rispettivamente i polimorfismi del nucleotide 238, del nucleotide 521 del nucleotide 744, secondo la numerazione di seq IDN1.

I frammenti e gli oligonucleotidi dell'invenzione possono essere marcati, ad esempio con uno o più marcatori scelti tra: radioisotopi, enzimi, biotina-avidina o altre molecole fluorescenti adatte a visualizzarli tramite specifici saggi.

Secondo un ulteriore aspetto l'invenzione riguarda gli oligonucleotidi ed i polinucleotidi caratterizzati dal fatto di comprendere i polimorfismi su descritti e gli acidi nucleici ad essi complementari, nonché i peptidi e le proteine ferroportina in forma mutata per uso terapeutico. In buona sostanza data l'importanza e l'incidenza dell'emocromatosi su base ereditaria l'invenzione comprende tutti gli acidi nucleici e le proteine



dell'invenzione per uso terapeutico. Secondo un aspetto preferito l'invenzione comprende gli acidi nucleici di sequenza IDN 3, 5 e 7 e loro frammenti, gli oligonucleotidi comprendenti le sequenze IDN23-25, e quelli ad essi complementari, le proteine di sequenza IDN 4, 6, 8 ed i peptidi da esse derivate comprendenti la sostituzione aminoacidica derivata dal polimorfismo, per uso terapeutico.

I polinucleotidi secondo l'invenzione possono inoltre utilizzati per la preparazione di cellule e di mammiferi transgenici non umani comprendenti il transgene codificante per almeno una delle forma mutate della ferroportina 1 dell'invenzione. Il trangene può essere integrato stabilmente nel genoma della cellula animale oppure essere presente in forma transiente.

Dette cellule, tessuti o animali non umani sono utili come modelli per lo studio della funzionalità del gene e della proteina comprendenti la mutazioni secondo l'invenzione e del loro ruolo nell'insorgenza della emocromatosi ereditaria. Questi modelli sono di particolare importanza per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici per la cura dell'emocromatosi ereditaria non dipendente dal gene HFE o di una alterata omeostasi nell'accumulo di ferro.

In un ulteriore aspetto l'invenzione si riferisce ad un metodo per la diagnosi *in vitro* di emocromatosi ereditaria non legata al gene HFE, o di siderosi africana o di emocromatosi Bantu in un mammifero, preferibilmente *Homo Sapiens* anche in casi in cui l'unico tratto clinico evidenziabile sia solo iperferritinemia o anemia e comprendente i seguenti passaggi:

- a) isolamento degli acidi nucleici contenuti in un campione biologico ottenuto da detto mammifero;
- b) verifica della presenza in detto acido nucleico di una mutazione o di un polimorfismo secondo l'invenzione,

dove la presenza di almeno una di dette mutazioni o polimorfismi costituisce una indicazione che detto mammifero è affetto da una anomalia ereditaria nella regolazione dell'omeostasi di ferro, o più in particolare è affetto da emocromatosi ereditaria non-HFE, da siderosi africana, da anemia ereditaria con iperferritinemia o da malattia ereditaria da accumulo reticoloendoteliale del ferro.

Preferibilmente detto campione biologico è un campione di plasma, saliva, urina, fuci, liquido amniotico o tessuto o è rappresentato da cellule derivate da biopsie. Preferibilmente detto acido nucleico è DNA genomico o RNA. Nel casi in cui esso sia RNA, esso viene preferibilmente trasformato in DNA complementare (cDNA) tramite una reazione di trascrizione inversa.

Il DNA genomico o il cDNA sono analizzati direttamente oppure in seguito ad amplificazione *in vitro* tramite *polymerase chain reaction* (PCR) (Saiki e altri, Science 239: 487-491, 1988) o altre tecniche quali, ad esempio, *ligase chain reaction* (LCR) (Wu e altri, Genomics 4: 560-569, 1989) *strand displacement amplification* (SDA) (Walker e altri, PNAS USA 89: 392-396) o *self-sustained sequence replication* (3SR) (Fahy e altri, PCR Methods Appl. 1: 25-33, 1992).

Preferibilmente, il DNA genomico o il cDNA viene amplificato tramite PCR utilizzando una coppia di oligonucleotidi adatti all'amplificazione del

frammento di DNA comprendente il codone codificante l'aminoacido corrispondente alla posizione 80 o la 174 o la 248 di SEQ ID NO:2.

Coppie di oligonucleotidi adatti per amplificare la regione contenente la mutazione G80 sul DNA genomico sono quelli che amplificano il 3° esone e la cui sequenza corrisponde alle SEQ ID No:13 e SEQ ID No:14, mentre oligonucleotidi idonei all'amplificazione della regione comprendente la mutazione N174 e Q248 sul 6° esone sono quelli di sequenza SEQ ID No: 19 e SEQ ID No: 20. Gli oligonucleotidi di sequenza IDN9-22 rientrano pertanto nell'ambito della presente invenzione. Particolarmente preferita è la coppia di oligonucleotidi che amplifica la regione del 3° esone comprendente il polimorfismo responsabile della mutazione G80 cioè la coppia costituita dalle sequenze IDN13 e 14 e la coppia di oligonucleotidi che amplifica la regione del 6° esone comprendente il polimorfismo responsabile della mutazione Q248 ed il polimorfismo responsabile della mutazione N174, quali la coppia costituita dalle sequenze IDN19 e 20. Oligonucleotidi aventi specificità per gli esoni recanti le mutazioni possono essere identificati sulla sequenza del DNA genomico adiacente alle sequenze identificate con tali oligonucleotidi. Rientrano quindi nella presente invenzione oligonucleotidi comprendenti almeno 8 nucleotidi di ciascuno degli oligonucleotidi di sequenza IDN9-22, preferibilmente di seqIDN13 e 14 e 19-20.

Numerose tecniche, ben note nell'arte, possono essere utilizzate per individuare nel DNA genomico o nel cDNA la presenza delle mutazioni secondo l'invenzione. Tecniche adatte sono, ad esempio, tecniche



basate sull'utilizzo di enzimi di restrizione (Kan e altri, Lancet: 910-912, 1978), tecniche di ibridazione con sonde oligonucleotidiche allele-specifiche (Wallace ed altri, Nucl Acids Res 6: 3543-3557, 1978) tra cui, ad esempio, ibridazione con oligonucleotidi immobilizzati su filtri (Saiki e altri, PNAS USA 86: 6230-6234, 1989) o micro-chips (Chee e altri, Science 274:610-614, 1996) e *oligonucleotide arrays* (Maskos e altri, Nucl Acids Res 21: 2269-2270, 1993), PCR allele-specifica (Newton e altri Nucl Acid Res 17:2503-2516, 1989), *mismatch repair detection* (MRD) (Faham e Cox Genome Res: 474-482, 1995), *Single-strand conformational polymorphism analysis* (Ravnik-Glavac *et al*, Hum. Mol. Gen. 3: 801, 1994), gel elettroforesi in gradiente denaturante (Guldberg et al., Nucl. Acids Res. 22: 880, 1994), *Hot Cleavage* (Cotton et al. Proc.Natl. Acad Sci USA 85: 4397, 1988), *DNAse* (Youil e altri, PNAS USA 92: 87-91, 1995) e *RNAse protection assay* (Winter *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 7575, 1985; Meyers *et al.*, Science 230: 1242, 1985), *allele specific primer extension* (Syvanen e altri, Genomics 8: 684-692, 1990 e Syvanen e altri, Hum Mutat 13:1-10, 1999), *genetic bit analysis* (GBA) (Nikiforov e altri Nucl Acid Res 22:4167-4175, 1994), *primer-ligation assay* (OLA) (Landergen e altri, Science 241: 1077, 1988), *allele specific ligation chain reaction* (LCR) (Barrany PNAS USA 88:189-193, 1991), *gap-LCR* (Abravaya e altri Nucl Acids Res 23: 675-682, 1995), tecniche di sequenziamento, oppure Ligase Detection Reaction (descritta in US 6,312,892). Tecniche particolarmente preferite per l'individuazione della mutazione dell'invenzione sono tecniche basate sull'utilizzo di enzimi di restrizione, che è presente solo se è presente il

polimorfismo su indicato, sulla PCR allele specifica, sull'ibridazione, sul sequenziamento diretto o su set o microarray "computer readable"

Pertanto, secondo una prima applicazione preferita la verifica della presenza nel DNA analizzato della mutazione secondo l'invenzione avviene utilizzando tecniche basate sull'utilizzo di enzimi di restrizione e comprende i seguenti stadi:

- a) amplificazione del DNA genomico o del cDNA con una coppia di oligonucleotidi adatta all'amplificazione selettiva di un segmento di detto DNA comprendente il codone codificante l'aminoacido corrispondente alla posizione G80 o N174 o Q 248, dove preferibilmente tale amplificazione avviene con le coppie di oligonucleotidi 13 e 14 per le mutazioni sul 3° esone (G80) e con la coppia di oligonucleotidi 19 e 20 per le mutazioni sul 6° esone (N174 e Q248);
- b) incubazione del DNA amplificato con un enzima di restrizione in grado di riconoscere il sito di restrizione alterato (creato o distrutto) dalla mutazione;
- c) analisi della dimensione dei prodotti della digestione ed optionalmente confronto con il profilo di restrizione generato da un donatore sano;

in cui l'avvenuta o la mancata digestione su almeno una copia cromosomica è indice della presenza nel DNA del soggetto campione di almeno una delle mutazioni responsabili di emocromatosi ereditaria non-HFE.

L'analisi della dimensione dei prodotti della digestione viene effettuata,

ad esempio, tramite gel elettroforesi, utilizzando un marcatore di pesi molecolari, seguita da visualizzazione delle bande di DNA, tramite ad esempio di etidio bromuro.

Come verrà illustrato in dettaglio negli esempi sperimentali che descrivono una delle realizzazioni preferite del metodo di diagnosi dell'invenzione, il polimorfismo del nucleotide in posizione 238 (G A) che determina la comparsa nella proteina corrispondente della sostituzione G80S determina anche la comparsa del sito di riconoscimento per l'enzima TspR1: il frammento di 421 bp amplificato con i primer di sequenza IDN 13 e 14 (esone 3), è digerito solo in presenza del polimorfismo, in due bande di 238 e 183 paia di basi, mentre rimane inalterato nel wild type.

La presenza del polimorfismo del nucleotide 521 (A T) che determina la sostituzione N174I nella proteina corrispondente, è rivelata dopo amplificazione del DNA genomico con la coppia di primers corrispondenti all'esone 6 (seq IDN19 e 20), mediante digestione con Bsml. Il polimorfismo determina la perdita della sequenza di riconoscimento per il sito di restrizione e pertanto dopo amplificazione del DNA e digestione si evidenzia la presenza del frammento intero di 425 bp: nel soggetto normale (wild type) invece, l'amplificato viene invece digerito in due frammenti di 342 e 83 bp.

La presenza del polimorfismo G T in posizione 744 di seq IDN1, che determina la sostituzione Q248H nella proteina corrispondente, è evidenziabile dopo amplificazione della regione esonica di 425 bp con la coppia di primers di seqIDN 19 e 20 (esone 6), mediante digestione con

PvuII: sequenza mutata abolisce il sito di restrizione dell'enzima e si ha quindi la comparsa di una banda di 425 bp, mentre la presenza dell'allele wild type è evidenziabile grazie alla presenza di una banda di 302 e di una di 123 bp.

I suddetti polimorfismi possono essere rivelati utilizzando perdita o l'acquisizione dei siti di restrizione sopra citati individuando anche sul cDNA primers opportuni per l'amplificazione.

Secondo una ulteriore applicazione preferita l'individuazione della mutazione secondo l'invenzione viene eseguita tramite tecniche di ibridazione in cui sono utilizzati frammenti dell'acido nucleico dell'invenzione o oligonucleotidi specifici per la mutazione secondo l'invenzione. Detti frammenti o oligonucleotidi sono in grado di ibridare in modo specifico ad una sequenza dell'acido nucleico dell'invenzione comprendente il codone mutato anche quando detta sequenza è presente insieme a numerose altre sequenze.

L'esperto del ramo è in grado di selezionare di volta in volta le condizioni di ibridazione e la lunghezza e sequenza dei frammenti o degli oligonucleotidi più adatte alla particolare tecnica di ibridazione utilizzata e al tipo di DNA che si sta analizzando (DNA genomico o complementare, amplificato o clonato in vettori opportuni).

Il metodo per rivelare i polimorfismi descritti nell'invenzione è di utilità diagnostica per rivelare la base genetica di una alterata omeostasi del ferro dove tale alterata omeostasi del ferro può portare sia ad anemia che ad iperferritinemia. In particolare il polimorfismo Q248H è di utilità diagnostica per rivelare la base genetica della patologia identificata



come siderosi africana o bantu, o di una semplice anemia.

Secondo una ulteriore realizzazione preferita, il metodo diagnostico prevede l'utilizzo di una PCR allele-specifica, in cui il DNA genomico o complementare viene sottoposto ad una reazione di PCR in cui sono utilizzati oligonucleotidi in grado di amplificare in modo selettivo un segmento di detto DNA comprendente il codone mutato e non il corrispondente segmento comprendente il codone non mutato.

In una sua realizzazione particolarmente preferita gli oligonucleotidi dell'invenzione, utilizzati per rivelare la presenza di almeno uno dei polimorfismi descritti nell'invenzione, sono chimicamente legati ad un supporto solido preferibilmente di vetro o su microchip (bidimensionale o sferico quale il "bead"), sono "computer readable", sono preferibilmente organizzati a matrice (array) e sono caratterizzati dal fatto di comprendere almeno uno dei polimorfismi dell'invenzione o almeno uno degli oligonucleotidi o dei polinucleotidi dell'invenzione.

La presente invenzione comprende inoltre kit diagnostici per la diagnosi della base genetica responsabile di una alterata omeostasi del ferro dovuta ai polimorfismi su indicati, associata o meno ad iperferritienemia o ad anemia basati sull'analisi molecolare del DNA. Tali kit sono caratterizzati dal fatto di comprendere almeno uno degli oligonucleotidi o polinucleotidi dell'invenzione, rivelando i polimorfismi oggetto della presente invenzione. Secondo una applicazione particolarmente preferita detti kit diagnostici comprendono la coppia di oligonucleotidi per l'amplificazione dell'esone 3 (seq IDN13 e 14) e la coppia di oligonucleotidi per l'amplificazione dell'esone 6 (seqIDN19 e 20), e gli

enzimi TspR1, Bsml e Pvull. Altenativamente tali kit comprendono inoltre polinucleotidi comprendenti gli oligonucleotidi di sequenza IDN 25 26 o 27. Inoltre tali kit possono comprendere opzionalmente anche oligonucleotidi e l'enzima di restrizione per rivelare la mutazione A77D determinata dal polimorfismo descritto nella domanda di brevetto WO 02/33119.

La presente invenzione si riferisce inoltre ad un metodo per la diagnosi *in vitro* dell'emocromatosi ereditaria in un mammifero comprendente la verifica della presenza in un campione biologico di detto mammifero di una proteina ferroportina 1 mutata secondo l'invenzione, in cui l'identificazione di detta proteina è una indicazione che l'individuo è affetto da emocromatosi ereditaria.

Preferibilmente detta verifica viene eseguita attraverso saggi immunologici in cui sono utilizzati anticorpi monoclonali o policlonali in grado di discriminare tra una molecola di ferroportina mutata secondo l'invenzione e una molecola di ferroportina *wild-type*.

Pertanto la presente invenzione si riferisce anche ad anticorpi, monoclonali o policlonali, in grado di riconoscere in modo specifico una molecola di ferroportina 1 mutata secondo l'invenzione o un peptide o un epitopo di essa comprendente la mutazione. Tali anticorpi sono ottenuti attraverso metodi ben noti nell'arte quali, ad esempio, quelli descritti da Harlow e Lane in *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory 1988.

Gli anticorpi dell'invenzione presentano particolare utilità, oltre che come reagenti diagnostici, per studiare le caratteristiche della proteina o a

scopi terapeutici. Ad esempio, detti anticorpi possono essere utilizzati per individuare la precisa localizzazione tessutale o cellulare della proteina mutata, studiarne le caratteristiche biochimiche o purificarla per immunoaffinità.

Sono quindi compresi nell'ambito della presente invenzione, kit per lo studio delle funzioni dei mutanti di ferroportina, basati sul riconoscimento immunospecifico di forme di ferroportina mutate, preferibilmente comprendenti anticorpi specifici per le mutazioni G80S, N174I, Q248H ed optionalmente standard costituiti da peptidi o dalle proteine mutate espresse in forma ricombinante ed optionalmente peptidi in grado di competere con il ligando, per la messa a punto di saggi ELISA o western Blot, oppure di radioimmunoprecipitazione in fase liquida o solida.

#### PARTE Sperimentale

##### ESEMPIO 1. Identificazione delle mutazioni nel gene della ferroportina.

DNA genomico dei soggetti indice, dei familiari e dei controlli è stato estratto da leucociti ottenuti da campioni di sangue utilizzando un kit per l'estrazione di DNA dal sangue (Qiagen).

Il DNA ottenuto è stato quindi amplificato tramite PCR utilizzando coppie di primers che amplificassero l'intera regione codificante, comprese le zone di confine tra esone-introne, della ferroportina.

Sono state impiegate le seguenti coppie di primers:

Esone 1: Fw.1: 5'-GGTGCTATCTCCAGTTCCTT-3' (IDN 9)

Rv.1: 5'-GTTCACAGCAGAGGCCACATT-3' (IDN 10)

Esone 2: Fw.2: 5'-CAGCTCATTAAGTGAACATCCATCGC-3' (IDN 11)  
Rv.2: 5'-GGCTTAATACAACGGCTAGAACG-3' (IDN 12)

Esone 3: Fw.3: 5'-CATAATGTAGCCAGGAAGTGCCC-3' (IDN 13)  
Rv.3: 5'-TCCAGAGGTGGTGCATCTAAG-3' (IDN 14)

Esone 4: Fw.4: 5'-GAGACATTTGATGTAATGTACAC-3' (IDN 15)  
Rv.4: 5'-CTACCAGATATTCAATTTCTGCC-3' (IDN 16)

Esone 5: Fw.5: 5'-CCACCAAAGACTATTTAACTGC-3' (IDN 17)  
Rv.5: 5'-TCACCACCGATTAAAGTGAATCC-3' (IDN 18)

Esone 6: Fw.6: 5'-GTATTGTGTAATGGGCAGTCTC-3' (IDN 19)  
Rv.6: 5'-CCCCACTGGTAATAAACCTG-3' (IDN 20)

Esone 7: Fw.7: 5'-GGCTTTATTCATGTCCCTCC-3' (IDN 21)  
Rv.7: 5'-ACATTTAGGAAACATTCAGATC-3' (IDN 22)

Esone 8: Fw.8: 5'-AAGGTGACTAAAGACAGTCAGGC-3' (IDN 23)  
Rv.8: 5'-GCTGACTTAGGTTCTAACAGGC-3' (IDN 24)

L'amplificazione delle regioni corrispondenti a ciascun esone è stata effettuata come segue: 200 ng di DNA genomico sono stati amplificati in 50 µl finali di tampone di reazione 1X contenente dNTP 200 µM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 25 picomoli di ciascuno dei sopra descritti oligonucleotide, 1 unità di enzima di Taq polimerasi (Applied Biosystems). Per la reazione di amplificazione è stato utilizzato un programma di 30 cicli, ognuno dei quali era caratterizzato dal seguente profilo termico:

94°C per 1 minuto,

58°C per 40 secondi,

75°C per 5 minuti.

I frammenti ottenuti sono stati purificati e sequenziati mediante



sequenziamento automatico con Sequenziatore Beckman Coulter.

L'analisi della sequenza ha portato alla identificazione nell'esone 3 della mutazione G80S e nell'esone 6 delle mutazioni N174I e Q248H rispetto alla sequenza wild type (GenBank numero di accesso: AF231121), che non fu invece rilevata in nessuno dei soggetti controllo.

Un'ulteriore verifica delle mutazioni fu ottenuta digerendo un'aliquota dello stesso prodotto di PCR iniziale con endonucleasi il cui sito di restrizione è modificato dal cambio nucleotidico.

In particolare la mutazione Q248H fu verificata digerendo, in accordo con le condizioni suggerite dalla ditta produttrice (New England BioLabs), il prodotto iniziale di PCR con l'enzima *PvuII*, che taglia tra GC nella sequenza 5' CAGCTG 3'. Il cambio di base G→T nella sequenza mutata abolisce il sito di restrizione dell'enzima.

Esempio 2. Caratterizzazione del quadro clinico dei soggetti recanti la mutazione Q248H.

Fu valutato il quadro clinico di soggetti africani normali o affetti da siderosi Bantu (legata cioè all'accumulo eccessivo di birra preparata in recipienti di ferro) in cui era presente la mutazione Q248H. In tali soggetti la mutazione corrella con una ipperferritinemia più elevata che in soggetti che non hanno la mutazione ma consumano livelli simili di alcool. Paradossalmente, la presenza della mutazione determina anche una condizione di anemia, con calo altamente significativo dell'emoglobina.

Quindi la mutazione ha un effetto aggravante su una condizione preesistente di eccesso di ferro.

Nei pazienti di colore americani affetti da uno stato portatore di

talassemia, la mutazione provoca un fenotipo più grave, con ipperferritinemia e deposito di ferro nelle cellule reticoloendoteliali (macrofagiche) del midollo e del fegato pur senza che i pazienti abbiano subito trasfusioni di sangue (pratica che può portare ad accumulo di ferro nelle cellule macrofagiche).

Iperferritinemia ed accumulo di ferro nelle cellule reticolendoteliali corrispondono al quadro clinico osservato dagli stessi autori della presente invenzione in Pietrangelo et al., 1999, N. Engl. J. Med, 3341: 725-732.

La mutazione è inoltre un marcitore della popolazione nera di origine africana: essa è risultata infatti assente in un campione costituito da 300 donatori sani bianchi caucasici.

Nella popolazione africana furono testati 100 cromosomi di soggetti africani apparentemente normali e 6 di questi cromosomi presentavano la mutazione. Parallelamente, la mutazione fu ritrovata in 4 soggetti su 100 di un campione di donatori americani di colore.

L'analisi di questi soggetti apparentemente sani ha mostrato una tendenza dei livelli di ferritinemia a valori più elevati ed una emoglobinemìa significativamente più bassa rispetto a quelli senza mutazione. La mutazione quindi non è in grado di provocare una malattia, ma provoca un fenotipo più severo in associazione ad altri fattori (ad es. consumo alcolico, talassemia). Inoltre, nella popolazione nera africana ed americana potrebbe contribuire a determinare i livelli di emoglobina tendenzialmente più bassi, e di ferritinemia tendenzialmente più alti. Queste conclusioni emergono anche dalla lettura della Tabella 1

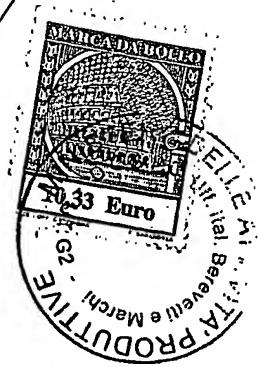
presentate nella parte sperimentale in cui sono riportati di dati di ferritinemia ed emoglobina dei pazienti con la mutazione nelle famiglie africane, in quella americana e nella popolazione di colore apparentemente sana.

Tabella 1. Valutazione dell'assetto marziale e dell'emoglobina in relazione alla mutazione Q248H della ferroportina in Africani e Afroamericani. I membri delle famiglie provengono da tre pedigree africani ed uno afroamericano. La numerosità del gruppo è indicata sotto ogni parametro (N=).

Membri delle famiglie (esclusi i casi affetti)	Ferroportina mutazione Q248H (N = 10)	Ferroportina normale (N = 11)	p
Ferritina (microg/L; media geometrica e SE range)	76(47-125)	95(62-147)	0.748
Ferritina/AST ratio* (microg/U; media ± SE)	14.7±4.6	5.5±4.1	0.171
Saturazione della Transferrina (media ± SE)	36 ± 7	22 ± 8	0.258
Emoglobina*** (g/dL; media ± SE)	11.8 ± 0.6	13.3 ± 0.5	0.088
Africani normali (N = 7)		(N = 44)	
Ferritina (microg/L; media geometrica e SE range)	61(38-97)	34(28-40)	0.251
Saturazione della Transferrina (%; media ± SE)	28 ± 5	26 ± 2	0.684
Emoglobina (g/dL; media SE)	12.5 ± 0.5	13.7 ± 0.2	0.039
Membri delle famiglie e controlli combinati (N = 17)		(N = 55)	
Ferritina/AST ratio (microg/U; media e SE range)	61(44-82)	44(37-51)	0.358
Transferrin saturation (media ± SE)	30 ± 4	26 ± 2	0.357
Emoglobina (g/dL; media ± SE)	12.1 ± 0.4	13.6±0.2	<0.0005

Il confronto statistico è stato effettuato mediante il test ANOVA aggiustando per età, sesso e, per gli africani, consumo di birra. Nello studio pilota di screening per la mutazione Q248H sono stati inclusi i familiari dei pazienti con sovraccarico di ferro (n. 21) e soggetti africani

con parametri normali del metabolismo del ferro. Si nota come, anche in queste popolazioni «normali», la presenza della mutazione Q248H si associa ad una tendenza a ferritinemia più elevata e soprattutto ad un significativo calo dell'emoglobina.



#### **ESEMPIO 3. Messa a punto del metodo diagnostico mediante PCR.**

Dal sequenziamento delle regioni esoniche amplificate come descritto nell'esempio 1, risultò che il polimorfismo del nucleotide 238 della sequenza IDN1, consistente nella sostituzione di una guanina con una adenosina (G A) responsabile della sostituzione della glicina in posizione 80 della seq IDN2 con serina (G80S) nella rispettiva proteina codificata, determina la comparsa di un sito di restrizione per l'enzima TspR1. La sequenza dell'intero cDNA codificante per la forma mutata di ferroportina in posizione 80 (G80S) è riportato nell'Allegato sequenze come sequenza IDN3.

In figura 1B è mostrato il profilo di restrizione del DNA genomico amplificato da ciascun individuo: nel caso di soggetti sani, che presentano solo la sequenza *wild type*, in seguito a digestione con TspR1 il frammento DNA amplificato con la coppia di oligonucleotidi 13 e 14, di 421 paia di basi, non viene digerito. Nei soggetti affetti dalla patologia, eterozigoti per la mutazione, il DNA amplificato viene digerito in una banda di 421 paia di basi (allele normale) e in due bande di 238 e 183 paia di basi (quest'ultima non visibile in Figura 1b).

Il polimorfismo del nucleotide 521 della sequenza IDN1, consistente nella sostituzione di una adenina con una timina (A T), responsabile della sostituzione dell'aminoacido 174 asparagina con isoleucina (N174I)

nella rispettiva proteina codificata, determina invece abolizione della sequenza di riconoscimento per l'enzima di restrizione Bsml e quindi il frammento di DNA del 6° esone, amplificato da soggetti portatori del polimorfismo con la coppia di oligonucleotidi 19 e 20, non viene digerito.

La sequenza dell'intero cDNA codificante per la forma mutata di ferroportina in posizione 174 (N174I) è riportato nell'Allegato sequenze come sequenza IDN5.

In figura 2 pannello B, è rappresentato il profilo di restrizione ottenuto in seguito a digestione con Bsml del DNA amplificato da individui sani e portatori del polimorfismo. Nel caso di soggetti sani che presentano solo la sequenza *wild type* in seguito a digestione con Bsml del frammento di DNA amplificato con la coppia di primer 19 e 20, di 425 paia di basi, viene digerito in due frammenti di 342 e 83 paia di basi. Nei soggetti portatori della patologia, eterozigoti per la mutazione, in seguito a digestione con Bsml si ottengono tre bande: una banda di 425 paia di basi (allele mutato) e due bande di 342 e 83 paia di basi (allele wild-type).

Il polimorfismo del nucleotide 744 della sequenza IDN1, consistente nella sostituzione di una guanina con timina (G T), determina la sostituzione dell'aminoacido 248 (glutammina) con istidina (Q248H) nella rispettiva proteina codificata e l'abolizione del sito di riconoscimento per l'enzima Pvull. La sequenza dell'intero cDNA codificante per la forma mutata di ferroportina in posizione 248 (Q248H) è riportato nell'Allegato sequenze come sequenza IDN7.

In figura 3B è riportato il profilo di restrizione ottenuto in seguito a

digestione con Pvull del DNA amplificato da individui sani o portatori del polimorfismo: nel caso di soggetti sani che presentano solo la sequenza *wild type*, il DNA amplificato di 425 paia di basi, viene digerito con l'enzima di restrizione Pvull. Nei soggetti eterozigoti, portatori della patologia, un allele viene digerito e l'altro no così che si ottengono tre bande: una banda di 425 paia di basi (allele mutato) e due bande di 302 e 123 paia di basi (allele wild-type).

**RIVENDICAZIONI**

1. Polinucleotide isolato codificante una ferroportina 1 mutata in uno dei seguenti aminoacidi:
  - amminoacido in posizione 80 della seq IDN2,
  - amminoacido in posizione 174 della seq IDN2,
  - amminoacido in posizione 248 della seq IDN2,rispetto alla sequenza wild type.
2. Polinucleotide secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che l'amminoacido in posizione 80 è diverso da glicina.
3. Polinucleotide secondo la rivendicazione 2 caratterizzato dal fatto di presentare un polimorfismo al nucleotide 238 della sequenza IDN1.
4. Polinucleotide secondo la rivendicazione 3 caratterizzato dal fatto che detto polimorfismo è una sostituzione di una G con una A.
5. Polinucleotide secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che tale amminoacido in posizione 174 è diverso da asparagina.
6. Polinucleotide secondo la rivendicazione 5 caratterizzato dal fatto di presentare un polimorfismo al nucleotide 521 della sequenza IDN1.
7. Polinucleotide secondo la rivendicazione 6 caratterizzato dal fatto che detto polimorfismo è una sostituzione di una A con una T.
8. Polinucleotide secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che tale amminoacido in posizione 248 è diverso da glutammina.
9. Polinucleotide secondo la rivendicazione 8 caratterizzato dal fatto di presentare un polimorfismo al nucleotide 744 della sequenza IDN1.
10. Polinucleotide secondo la rivendicazione 9 caratterizzato dal fatto che detto polimorfismo è una sostituzione di una G con una T.

11. Polinucleotide secondo le rivendicazioni 1-10 caratterizzato dal fatto di essere DNA genomico.

12. Polinucleotide secondo le rivendicazioni 1-10 caratterizzato dal fatto di essere mRNA.

13. Polinucleotide secondo le rivendicazioni 1-10 caratterizzato dal fatto di essere cDNA.

14. Polinucleotidi codificanti per una ferroportina mutata secondo la rivendicazione 1 caratterizzati da una sequenza nucleotidica corrispondente alla seqIDN3 o alla seqIDN 5 o alla seqIDN7.

15. Polinucleotide di almeno 10 nucleotidi consecutivi derivato dalla sequenza IDN3 5 o 7 e caratterizzato dal fatto di comprendere almeno uno dei nucleotidi polimorfici rispettivamente scelti tra: polimorfismo corrispondente alla posizione 238 della seqIDN3, polimorfismo corrispondente alla posizione 521 della seqIDN5 o polimorfismo corrispondente alla posizione 744 della seqIDN7.

16. Polinucleotidi secondo la rivendicazione 15 caratterizzati dal fatto di comprendere almeno uno degli oligonucleotidi di sequenza corrispondente alle sequenze IDN9-27.

17. Polinucleotidi avente sequenza complementare rispetto ai polinucleotidi secondo le rivendicazioni 14-16.

18. Polinucleotide secondo le rivendicazioni 1-16 caratterizzato dal fatto di essere marcato.

19. Vettore ricombinante caratterizzato dal fatto di comprendere il polinucleotide secondo le rivendicazioni 1-17.

20. Cellula isolata caratterizzata dal fatto di essere transfettata o



trasformata con il vettore ricombinante secondo la rivendicazione 19.

20. Cellula eucariota, tessuto o animale non umano comprendente un transgene dove tale transgene è almeno un polinucleotide secondo la rivendicazioni 1-16.

21. Ferroportina 1 mutata codificata dai polinucleotidi secondo le rivendicazioni 1-16.

22. Ferroportina mutata secondo la rivendicazione 21 avente sequenza amminoacidica corrispondente ad almeno una delle sequenze IDN4, 6, 8 o loro frammenti.

23. Peptide avente una lunghezza di almeno 6 aminoacidi ed una sequenza parziale derivata da almeno una delle sequenze scelte tra: seq IDN4, 6 o 8 e caratterizzato dal fatto di comprendere almeno uno degli aminoacidi mutati in posizione corrispondente alle posizioni 80, 174 o 248 di SEQ ID NO: 2.

24. Polinucleotidi secondo le rivendicazioni 1-17 per uso terapeutico.

25. Peptidi secondo la rivendicazione 23 per uso terapeutico.

26. Ferroportina 1 mutata secondo la rivendicazione 22 per uso terapeutico.

27. Metodo per rivelare polimorfismi nel gene della ferroportina caratterizzato dal fatto di utilizzare almeno uno dei polinucleotidi secondo le rivendicazioni 1-18.

28. Metodo secondo la rivendicazione 24 dove tali polimorfismi sono inoltre associati a iperferritinemia o anemia.

29. Metodo per la diagnosi *in vitro* di emocromatosi ereditaria non legata al gene HFE in un mammifero comprendente i seguenti passaggi:

- a) isolamento di DNA genomico o RNA da un campione biologico ottenuto da un mammifero;
- b) verifica della presenza in detto DNA genomico o RNA di almeno uno dei polimorfismi secondo le rivendicazioni 4, 7, 10, in cui la presenza di almeno una di detti polimorfismi è una indicazione che detto mammifero è affetto da emocromatosi ereditaria non HFE o è predisposto allo sviluppo di tale patologia.

27. Metodo per la diagnosi *in vitro* di una alterata omeostasi del ferro su base genetica che consiste essenzialmente nella verifica della presenza in un campione di DNA genomico o di RNA o di cDNA di almeno uno dei polimorfismi scelti tra: polimorfismo corrispondente alla posizione 238 della seqIDN3, polimorfismo corrispondente alla posizione 521 della seqIDN5 o polimorfismo corrispondente alla posizione 744 della seqIDN7.

28. Metodo secondo la rivendicazione 27 dove tale alterata omeostasi del ferro è anemia o iperferritinemia, siderosi africana o bantu, o emocromatosi ereditaria non HFE.

29. Metodo secondo la rivendicazione 28 per la diagnosi *in vitro* della siderosi africana o emocromatosi bantu in un mammifero comprendente i seguenti stadi:

- a) isolamento di DNA genomico o RNA da un campione biologico ottenuto da detto mammifero;
- b) verifica della presenza in detto DNA genomico o RNA della presenza di un polimorfismo del nucleotide corrispondente al nucleotide 744 di seqIDN1,

in cui la presenza di detto polimorfismo è una indicazione che detto mammifero è affetto da siderosi africana o emocromatosi Bantu o è predisposto allo sviluppo di tale patologia.

30. Metodo secondo le rivendicazioni 25-28 caratterizzato dal fatto che prima di detta verifica l'RNA viene trascritto in cDNA mediante retrotrascrittasi inversa.
31. Metodo secondo le rivendicazioni 26-30 dove detta verifica viene effettuata dopo amplificazione mediante PCR con una coppia di oligonucleotidi adatti, di un frammento di DNA comprendente almeno uno dei seguenti nucleotidi polimorfici: nucleotide corrispondente alla posizione 238, nucleotide corrispondente alla posizione 521, nucleotide corrispondente alla posizione 744 di SEQ ID NO: 1.
32. Metodo secondo la rivendicazione 31 caratterizzato dal fatto che per detta amplificazione è utilizzato almeno uno dei seguenti oligonucleotidi: IDN 13, 14, 19 e 20.
33. Metodo secondo le rivendicazioni 26-32 caratterizzato dal fatto che detto mammifero è *Homo sapiens*.
34. Metodo secondo le rivendicazioni 25 e 28 caratterizzato dal fatto che detto campione biologico è un campione di sangue, plasma, saliva, urina, feci, liquido amniotico o tessuto.
35. Metodo secondo le rivendicazioni 25-34 caratterizzato dal fatto che detta verifica viene eseguita utilizzando una tecnica scelta nel gruppo consistente di: acquisizione o perdita di un sito di riconoscimento per un enzima di restrizione, tecniche di ibridazione con sonde oligonucleotidiche allele-specifiche secondo le



rivendicazioni 15-17, PCR allele-specifica, mismatch repair detection, single-strand conformational polymorphism analysis, gel elettroforesi in gradiente denaturante, Hot Cleavage, DNase e RNAse protection assay, allele specific primer extension, genetic bit analysis oligonucleotide-ligation assay, allele specific ligation chain reaction e tecniche di sequenziamento.

36. Metodo secondo la rivendicazione 35 caratterizzato dal fatto che detta verifica viene eseguita tramite tecniche basate sull'utilizzo di enzimi di restrizione, PCR allele specifica, tecniche di ibridazione o di sequenziamento.
37. Metodo secondo la rivendicazione 36 dove detti enzimi di restrizione sono scelti tra: TspR1, Bsml, Pvull.
38. Metodo per la diagnosi *in vitro* di emocromatosi ereditaria in un mammifero comprendente la verifica della presenza in un campione biologico ottenuto da detto mammifero di una proteina ferroportina 1 mutata secondo la rivendicazione 21, in cui la presenza di detta proteina è una indicazione che detto mammifero è affetto da emocromatosi ereditaria.
39. Metodo secondo la rivendicazione 38 in cui detta identificazione viene eseguita utilizzando anticorpi in grado di riconoscere in modo specifico detta ferroportina 1 mutata.
40. Anticorpi monoclonali o policlonali in grado di riconoscere in modo specifico una proteina ferroportina 1 mutata secondo le rivendicazioni 21-22.
41. Uso degli anticorpi secondo la rivendicazione 40 per l'inattivazione

specifica di una proteina ferroportina 1 mutata in accordo con la rivendicazione 21.

42. Supporto "computer readable" caratterizzato dal fatto di comprendere almeno dei polinucleotidi in accordo con le rivendicazioni 1-17.
43. Uso dei polinucleotidi secondo le rivendicazioni 1-17 per la rivelazione di polimorfismi nel gene della ferroportina.
44. Uso dei polinucleotidi secondo le rivendicazioni 1-17 per la preparazione di un medicamento per la cura di patologie caratterizzate da una alterata omeostasi del ferro.
45. Uso dei polinucleotidi secondo le rivendicazioni 1-17 per modulare l'espressione del gene codificante per una ferroportina 1 mutata.
46. Kit per la diagnosi di emocromatosi ereditaria non HFE dipendente comprendente almeno uno degli oligonucleotidi secondo le rivendicazioni 1-17.
47. Kit per la diagnosi della base genetica di una alterata omeostasi del ferro comprendente almeno uno dei polinucleotidi secondo le rivendicazioni 1-17.
48. Kit per la diagnosi dei polimorfismi di almeno uno dei polimorfismi scelti tra: polimorfismo del nucleotide corrispondente alla posizione 238, polimorfismo del nucleotide corrispondente alla posizione 521, polimorfismo del nucleotide corrispondente alla posizione 744 di SEQ ID NO: 1 caratterizzato dal fatto di comprendere almeno uno degli oligonucleotidi di sequenza: IDN13, 14, 19, 20 in combinazione con almeno una tra i seguenti enzimi di restrizione: TspR1, Bsml, Pvull.

3946PTIT

Notarbartolo & Gervasi S.p.A.

(SM/pd)

Milano, li 9 Giugno 2003

p. PIETRANGELO ANTONELLO

il Mandatario

*S.M.*

*Gemma Gervasi*  
Dr.ssa Gemma Gervasi

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

10/560157

LISTATO SEQUENZE IAP13 Rec'd PCT/PTO 09 DEC 2005

&lt;110&gt; Pietrangelo, Antonello

&lt;120&gt; Mutazioni nel gene della ferroportina associate ad emocromatosi ereditaria

&lt;130&gt; 3946

&lt;160&gt; 27

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1716

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1716)

&lt;223&gt; cDNA codificante per la ferroportina wid type . Polimorfismi relativi ai codoni:

238-240 (G80), 520-522 (N174), 742-744 (Q248)

&lt;400&gt; 1

atg acc agg gcg gga gat cac aac cgc cag aga gga tgc tgt gga tcc	48
Met Thr Arg Ala Gly Asp His Asn Arg Gln Arg Gly Cys Cys Gly Ser	
1                       5                       10                       15	

ttg gcc gac tac ctg acc tct gca aaa ttc ctt ctc tac ctt ggt cat	96
Leu Ala Asp Tyr Leu Thr Ser Ala Lys Phe Leu Leu Tyr Leu Gly His	
20                   25                       30	

tct ctc tct act tgg gga gat cgg atg tgg cac ttt gcg gtg tct gtg	144
Ser Leu Ser Thr Trp Gly Asp Arg Met Trp His Phe Ala Val Ser Val	
35                   40                       45	

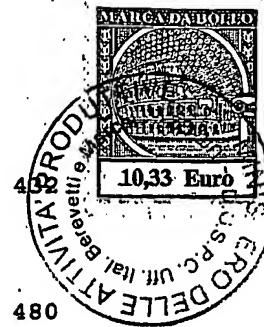
ttt ctg gta gag ctc tat gga aac agc ctc ctt ttg aca gca gtc tac	192
Phe Leu Val Glu Leu Tyr Gly Asn Ser Leu Leu Thr Ala Val Tyr	
50                   55                       60	

ggg ctg gtg gtg gca ggg tct gtt ctg gtc ctg gga gcc atc atc ggt	240
Gly Leu Val Val Ala Gly Ser Val Leu Val Leu Gly Ala Ile Ile Gly	
65                   70                       75                       80	

gac tgg gtg gac aag aat gct aga ctt aaa gtg gcc cag acc tcg ctg	288
Asp Trp Val Asp Lys Asn Ala Arg Leu Lys Val Ala Gln Thr Ser Leu	
85                   90                       95	

gtg gta cag aat gtt tca gtc atc ctg tgt gga atc atc ctg atg atg	336
Val Val Gln Asn Val Ser Val Ile Leu Cys Gly Ile Ile Leu Met Met	
100                  105                      110	

gtt ttc tta cat aaa cat gag ctt ctg acc atg tac cat gga tgg gtt	384
---	-----

*Janice Jore*

Val Phe Leu His Lys His Glu Leu Leu Thr Met Tyr His Gly Trp Val  
115 120 125

ctc act tcc tgc tat atc ctg atc atc act att gca aat att gca aat  
Leu Thr Ser Cys Tyr Ile Leu Ile Thr Ile Ala Asn Ile Ala Asn  
130 135 140

ttg gcc agt act gct act gca atc aca atc caa agg gat tgg att gtt  
Leu Ala Ser Thr Ala Thr Ala Ile Thr Ile Gln Arg Asp Trp Ile Val  
145 150 155 160

gtt gtt gca gga gaa gac aga agc aaa cta gca aat atg aat gcc aca  
Val Val Ala Gly Glu Asp Arg Ser Lys Leu Ala Asn Met Asn Ala Thr  
165 170 175

ata cga agg att gac cag tta acc aac atc tta gcc ccc atg gct gtt  
Ile Arg Arg Ile Asp Gln Leu Thr Asn Ile Leu Ala Pro Met Ala Val  
180 185 190

ggc cag att atg aca ttt ggc tcc cca gtc atc ggc tgg ttt att  
Gly Gln Ile Met Thr Phe Gly Ser Pro Val Ile Gly Cys Gly Phe Ile  
195 200 205

tcg gga tgg aac ttg gta tcc atg tgc gtg gag tac gtc ctg ctc tgg  
Ser Gly Trp Asn Leu Val Ser Met Cys Val Glu Tyr Val Leu Leu Trp  
210 215 220

aag gtt tac cag aaa acc cca gct cta gct gtg aaa gct ggt ctt aaa  
Lys Val Tyr Gln Lys Thr Pro Ala Leu Ala Val Lys Ala Gly Leu Lys  
225 230 235 240

gaa gag gaa act gaa ttg aaa cag ctg aat tta cac aaa gat act gag  
Glu Glu Glu Thr Glu Leu Lys Gln Leu Asn Leu His Lys Asp Thr Glu  
245 250 255

cca aaa ccc ctg gag gga act cat cta atg ggt gtg aaa gac tct aac  
Pro Lys Pro Leu Glu Gly Thr His Leu Met Gly Val Lys Asp Ser Asn  
260 265 270

atc cat gag ctt gaa cat gag caa gag cct act tgg gcc tcc cag atg  
Ile His Glu Leu Glu His Glu Gln Glu Pro Thr Cys Ala Ser Gln Met  
275 280 285

gct gag ccc ttc cgt acc ttc cga gat gga tgg gtc tcc tac tac aac  
Ala Glu Pro Phe Arg Thr Phe Arg Asp Gly Trp Val Ser Tyr Tyr Asn  
290 295 300

cag cct gtg ttt ctg gct ggc atg ggt ctt gct ttc ctt tat atg act  
Gln Pro Val Phe Leu Ala Gly Met Gly Leu Ala Phe Leu Tyr Met Thr  
305 310 315 320

gtc ctg ggc ttt gac tgc atc acc aca ggg tac gcc tac act cag gga  
Val Leu Gly Phe Asp Cys Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Tyr Thr Gln Gly  
325 330 335

ctg agt ggt tcc atc ctc agt att ttg atg gga gca tca gct ata act  
1056

Leu Ser Gly Ser Ile Leu Ser Ile Leu Met Gly Ala Ser Ala Ile Thr  
 340 345 350

gga ata atg gga act gta gct ttt act tgg cta cgt cga aaa tgt ggt 1104  
 Gly Ile Met Gly Thr Val Ala Phe Thr Trp Leu Arg Arg Lys Cys Gly  
 355 360 365

ttg gtt cgg aca ggt ctg atc tca gga ttg gca cag ctt tcc tgt ttg 1152  
 Leu Val Arg Thr Gly Leu Ile Ser Gly Leu Ala Gln Leu Ser Cys Leu  
 370 375 380

atc ttg tgt gtg atc tct gta ttc atg cct gga agc ccc ctg gac ttg 1200  
 Ile Leu Cys Val Ile Ser Val Phe Met Pro Gly Ser Pro Leu Asp Leu  
 385 390 395 400

tcc gtt tct cct ttt gaa gat atc cga tca agg ttc att caa gga gag 1248  
 Ser Val Ser Pro Phe Glu Asp Ile Arg Ser Arg Phe Ile Gln Gly Glu  
 405 410 415

tca att aca cct acc aag ata cct gaa att aca act gaa ata tac atg 1296  
 Ser Ile Thr Pro Thr Lys Ile Pro Glu Ile Thr Thr Glu Ile Tyr Met  
 420 425 430

tct aat ggg tct aat tct gct aat att gtc ccg gag aca agt cct gaa 1344  
 Ser Asn Gly Ser Asn Ser Ala Asn Ile Val Pro Glu Thr Ser Pro Glu  
 435 440 445

tct gtg ccc ata atc tct gtc agt ctg ctg ttt gca ggc gtc att gct 1392  
 Ser Val Pro Ile Ile Ser Val Ser Leu Leu Phe Ala Gly Val Ile Ala  
 450 455 460

gct aga atc ggt ctt tgg tcc ttt gat tta act gtg aca cag ttg ctg 1440  
 Ala Arg Ile Gly Leu Trp Ser Phe Asp Leu Thr Val Thr Gln Leu Leu  
 465 470 475 480

caa gaa aat gta att gaa tct gaa aga ggc att ata aat ggt gta cag 1488  
 Gln Glu Asn Val Ile Glu Ser Glu Arg Gly Ile Ile Asn Gly Val Gln  
 485 490 495

aac tcc atg aac tat ctt ctt gat ctt ctg cat ttc atc atg gtc atc 1536  
 Asn Ser Met Asn Tyr Leu Leu Asp Leu Leu His Phe Ile Met Val Ile  
 500 505 510

ctg gct cca aat cct gaa gct ttt ggc ttg ctc gta ttg att tca gtc 1584  
 Leu Ala Pro Asn Pro Glu Ala Phe Gly Leu Leu Val Leu Ile Ser Val  
 515 520 525

tcc ttt gtg gca atg ggc cac att atg tat ttc cga ttt gcc caa aat 1632  
 Ser Phe Val Ala Met Gly His Ile Met Tyr Phe Arg Phe Ala Gln Asn  
 530 535 540

act ctg gga aac aag ctc ttt gct tgc ggt cct gat gca aaa gaa gtt 1680  
 Thr Leu Gly Asn Lys Leu Phe Ala Cys Gly Pro Asp Ala Lys Glu Val  
 545 550 555 560

agg aag gaa aat caa gca aat aca tct gtt gtt tga 1716

*June 1981*

Arg Lys Glu Asn Gln Ala Asn Thr Ser Val Val  
 565                            570

<210> 2  
 <211> 571  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Thr Arg Ala Gly Asp His Asn Arg Gln Arg Gly Cys Cys Gly Ser  
 1                            5                            10                            15

Leu Ala Asp Tyr Leu Thr Ser Ala Lys Phe Leu Leu Tyr Leu Gly His  
 20                            25                            30

Ser Leu Ser Thr Trp Gly Asp Arg Met Trp His Phe Ala Val Ser Val  
 35                            40                            45

Phe Leu Val Glu Leu Tyr Gly Asn Ser Leu Leu Leu Thr Ala Val Tyr  
 50                            55                            60

Gly Leu Val Val Ala Gly Ser Val Leu Val Leu Gly Ala Ile Ile Gly  
 65                            70                            75                            80

Asp Trp Val Asp Lys Asn Ala Arg Leu Lys Val Ala Gln Thr Ser Leu  
 85                            90                            95

Val Val Gln Asn Val Ser Val Ile Leu Cys Gly Ile Ile Leu Met Met  
 100                            105                            110

Val Phe Leu His Lys His Glu Leu Leu Thr Met Tyr His Gly Trp Val  
 115                            120                            125

Leu Thr Ser Cys Tyr Ile Leu Ile Ile Thr Ile Ala Asn Ile Ala Asn  
 130                            135                            140

Leu Ala Ser Thr Ala Thr Ala Ile Thr Ile Gln Arg Asp Trp Ile Val  
 145                            150                            155                            160

Val Val Ala Gly Glu Asp Arg Ser Lys Leu Ala Asn Met Asn Ala Thr  
 165                            170                            175

Ile Arg Arg Ile Asp Gln Leu Thr Asn Ile Leu Ala Pro Met Ala Val

June 1980

180	185	190
Gly Gln Ile Met Thr Phe Gly Ser Pro Val Ile Gly Cys Gly Phe Ile		
195		205
Ser Gly Trp Asn Leu Val Ser Met Cys Val Glu Tyr Val Leu Leu Trp		
210	215	220
Lys Val Tyr Gln Lys Thr Pro Ala Leu Ala Val Lys Ala Gly Leu Lys		
225	230	235
240		
Glu Glu Glu Thr Glu Leu Lys Gln Leu Asn Leu His Lys Asp Thr Glu		
245	250	255
Pro Lys Pro Leu Glu Gly Thr His Leu Met Gly Val Lys Asp Ser Asn		
260	265	270
Ile His Glu Leu Glu His Glu Gln Glu Pro Thr Cys Ala Ser Gln Met		
275	280	285
Ala Glu Pro Phe Arg Thr Phe Arg Asp Gly Trp Val Ser Tyr Tyr Asn		
290	295	300
Gln Pro Val Phe Leu Ala Gly Met Gly Leu Ala Phe Leu Tyr Met Thr		
305	310	315
320		
Val Leu Gly Phe Asp Cys Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Tyr Thr Gln Gly		
325	330	335
Leu Ser Gly Ser Ile Leu Ser Ile Leu Met Gly Ala Ser Ala Ile Thr		
340	345	350
Gly Ile Met Gly Thr Val Ala Phe Thr Trp Leu Arg Arg Lys Cys Gly		
355	360	365
Leu Val Arg Thr Gly Leu Ile Ser Gly Leu Ala Gln Leu Ser Cys Leu		
370	375	380
Ile Leu Cys Val Ile Ser Val Phe Met Pro Gly Ser Pro Leu Asp Leu		
385	390	395
400		
Ser Val Ser Pro Phe Glu Asp Ile Arg Ser Arg Phe Ile Gln Gly Glu		

*Jean Joss*

405

410

415

Ser Ile Thr Pro Thr Lys Ile Pro Glu Ile Thr Thr Glu Ile Tyr Met  
 420 425 430



Ser Asn Gly Ser Asn Ser Ala Asn Ile Val Pro Glu Thr Ser Pro Glu  
 435 440 445

Ser Val Pro Ile Ile Ser Val Ser Leu Leu Phe Ala Gly Val Ile Ala  
 450 455 460

Ala Arg Ile Gly Leu Trp Ser Phe Asp Leu Thr Val Thr Gln Leu Leu  
 465 470 475 480

Gln Glu Asn Val Ile Glu Ser Glu Arg Gly Ile Ile Asn Gly Val Gln  
 485 490 495

Asn Ser Met Asn Tyr Leu Leu Asp Leu Leu His Phe Ile Met Val Ile  
 500 505 510

Leu Ala Pro Asn Pro Glu Ala Phe Gly Leu Leu Val Leu Ile Ser Val  
 515 520 525

Ser Phe Val Ala Met Gly His Ile Met Tyr Phe Arg Phe Ala Gln Asn  
 530 535 540

Thr Leu Gly Asn Lys Leu Phe Ala Cys Gly Pro Asp Ala Lys Glu Val  
 545 550 555 560

Arg Lys Glu Asn Gln Ala Asn Thr Ser Val Val  
 565 570

<210> 3  
 <211> 1716  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(1716)  
 <223> cDNA codificante per una ferroportina mutata in posizione (G80).

<400> 3  
 atg acc agg gcg gga gat cac aac cgc cag aga gga tgc tgt gga tcc 48

June 2011

Met Thr Arg Ala Gly Asp His Asn Arg Gln Arg Gly Cys Cys Gly Ser				
1	5	10	15	
ttg gcc gac tac ctg acc tct gca aaa ttc ctt ctc tac ctt ggt cat				96
Leu Ala Asp Tyr Leu Thr Ser Ala Lys Phe Leu Leu Tyr Leu Gly His				
20	25	30		
tct ctc tct act tgg gga gat cgg atg tgg cac ttt gcg gtg tct gtg				144
Ser Leu Ser Thr Trp Gly Asp Arg Met Trp His Phe Ala Val Ser Val				
35	40	45		
ttt ctg gta gag ctc tat gga aac agc ctc ctt ttg aca gca gtc tac				192
Phe Leu Val Glu Leu Tyr Gly Asn Ser Leu Leu Leu Thr Ala Val Tyr				
50	55	60		
ggg ctg gtg gca ggg tct gtt ctg gtc ctg gga gcc atc atc agt				240
Gly Leu Val Val Ala Gly Ser Val Leu Val Leu Gly Ala Ile Ile Ser				
65	70	75	80	
gac tgg gtg gac aag aat gct aga ctt aaa gtg gcc cag acc tcg ctg				288
Asp Trp Val Asp Lys Asn Ala Arg Leu Lys Val Ala Gln Thr Ser Leu				
85	90	95		
gtg gta cag aat gtt tca gtc atc ctg tgt gga atc atc ctg atg atg				336
Val Val Gln Asn Val Ser Val Ile Leu Cys Gly Ile Ile Leu Met Met				
100	105	110		
gtt ttc tta cat aaa cat gag ctt ctg acc atg tac cat gga tgg gtt				384
Val Phe Leu His Lys His Glu Leu Leu Thr Met Tyr His Gly Trp Val				
115	120	125		
ctc act tcc tgc tat atc ctg atc atc act att gca aat att gca aat				432
Leu Thr Ser Cys Tyr Ile Leu Ile Thr Ile Ala Asn Ile Ala Asn				
130	135	140		
ttg gcc agt act gct act gca atc aca atc caa agg gat tgg att gtt				480
Leu Ala Ser Thr Ala Thr Ala Ile Thr Ile Gln Arg Asp Trp Ile Val				
145	150	155	160	
gtt gtt gca gga gaa gac aga agc aaa cta gca aat atg aat gcc aca				528
Val Val Ala Gly Glu Asp Arg Ser Lys Leu Ala Asn Met Asn Ala Thr				
165	170	175		
ata cga agg att gac cag tta acc aac atc tta gcc ccc atg gct gtt				576
Ile Arg Arg Ile Asp Gln Leu Thr Asn Ile Leu Ala Pro Met Ala Val				
180	185	190		
ggc cag att atg aca ttt ggc tcc cca gtc atc ggc tgt ggc ttt att				624
Gly Gln Ile Met Thr Phe Gly Ser Pro Val Ile Gly Cys Gly Phe Ile				
195	200	205		
tcg gga tgg aac ttg gta tcc atg tgc gtg gag tac gtc ctg ctc tgg				672
Ser Gly Trp Asn Leu Val Ser Met Cys Val Glu Tyr Val Leu Leu Trp				
210	215	220		
aag gtt tac cag aaa acc cca gct cta gct gtg aaa gct ggt ctt aaa				720

Lys Val Tyr Gln Lys Thr Pro Ala Leu Ala Val Lys Ala Gly Ieu Lys  
 225 230 235 240

gaa gag gaa act gaa ttg aaa cag ctg aat tta cac aaa gat act gag 768  
 Glu Glu Glu Thr Glu Leu Lys Gln Leu Asn Leu His Lys Asp Thr Glu  
 245 250 255

cca aaa ccc ctg gag gga act cat cta atg ggt gtg aaa gac tct aac 816  
 Pro Lys Pro Leu Glu Gly Thr His Leu Met Gly Val Lys Asp Ser Asn  
 260 265 270

atc cat gag ctt gaa cat gag caa gag cct act tgt gcc tcc cag atg 864  
 Ile His Glu Leu Glu His Glu Gln Glu Pro Thr Cys Ala Ser Gln Met  
 275 280 285

gct gag ccc ttc cgt acc ttc cga gat gga tgg gtc tcc tac tac aac 912  
 Ala Glu Pro Phe Arg Thr Phe Arg Asp Gly Trp Val Ser Tyr Tyr Asn  
 290 295 300

cag cct gtg ttt ctg gct ggc atg ggt ctt gct ttc ctt tat atg act 960  
 Gln Pro Val Phe Leu Ala Gly Met Gly Leu Ala Phe Leu Tyr Met Thr  
 305 310 315 320

gtc ctg ggc ttt gac tgc atc acc aca ggg tac gcc tac act cag gga 1008  
 Val Leu Gly Phe Asp Cys Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Tyr Thr Gln Gly  
 325 330 335

ctg agt ggt tcc atc ctc agt att ttg atg gga gca tca gct ata act 1056  
 Leu Ser Gly Ser Ile Leu Ser Ile Leu Met Gly Ala Ser Ala Ile Thr  
 340 345 350

gga ata atg gga act gta gct ttt act tgg cta cgt cga aaa tgt ggt 1104  
 Gly Ile Met Gly Thr Val Ala Phe Thr Trp Leu Arg Arg Lys Cys Gly  
 355 360 365

ttg gtt cgg aca ggt ctg atc tca gga ttg gca cag ctt tcc tgt ttg 1152  
 Leu Val Arg Thr Gly Leu Ile Ser Gly Leu Ala Gln Leu Ser Cys Leu  
 370 375 380

atc ttg tgt gtg atc tct gta ttc atg cct gga agc ccc ctg gac ttg 1200  
 Ile Leu Cys Val Ile Ser Val Phe Met Pro Gly Ser Pro Leu Asp Leu  
 385 390 395 400

tcc gtt tct cct ttt gaa gat atc cga tca agg ttc att caa gga gag 1248  
 Ser Val Ser Pro Phe Glu Asp Ile Arg Ser Arg Phe Ile Gln Gly Glu  
 405 410 415

tca att aca cct acc aag ata cct gaa att aca act gaa ata tac atg 1296  
 Ser Ile Thr Pro Thr Lys Ile Pro Glu Ile Thr Thr Glu Ile Tyr Met  
 420 425 430

tct aat ggg tct aat tct gct aat att gtc ccg gag aca agt cct gaa 1344  
 Ser Asn Gly Ser Asn Ser Ala Asn Ile Val Pro Glu Thr Ser Pro Glu  
 435 440 445

tct gtg ccc ata atc tct gtc agt ctg ctg ttt gca ggc gtc att gct 1392

Janus Janus

Ser Val Pro Ile Ile Ser Val Ser Leu Leu Phe Ala Gly Val Ile Ala			
450	455	460	
gct aga atc ggt ctt tgg tcc ttt gat tta act gtg aca cag ttg ctg			1440
Ala Arg Ile Gly Leu Trp Ser Phe Asp Leu Thr Val Thr Gln Leu Leu			
465	470	475	480
caa gaa aat gta att gaa tct gaa aga ggc att ata aat ggt gta cag			1488
Gln Glu Asn Val Ile Glu Ser Glu Arg Gly Ile Ile Asn Gly Val Gln			
485	490	495	
aac tcc atg aac tat ctt ctt gat ctt ctg cat ttc atc atg gtc atc			1536
Asn Ser Met Asn Tyr Leu Leu Asp Leu Leu His Phe Ile Met Val Ile			
500	505	510	
ctg gct cca aat cct gaa gct ttt ggc ttg ctc gta ttg att tca gtc			1584
Leu Ala Pro Asn Pro Glu Ala Phe Gly Leu Leu Val Leu Ile Ser Val			
515	520	525	
tcc ttt gtg gca atg ggc cac att atg tat ttc cga ttt gcc caa aat			1632
Ser Phe Val Ala Met Gly His Ile Met Tyr Phe Arg Phe Ala Gln Asn			
530	535	540	
act ctg gga aac aag ctc ttt gct tgc ggt cct gat gca aaa gaa gtt			1680
Thr Leu Gly Asn Lys Leu Phe Ala Cys Gly Pro Asp Ala Lys Glu Val			
545	550	555	560
agg aag gaa aat caa gca aat aca tct gtt gtt tga			1716
Arg Lys Glu Asn Gln Ala Asn Thr Ser Val Val			
565	570		
<210> 4			
<211> 571			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 4			
Met Thr Arg Ala Gly Asp His Asn Arg Gln Arg Gly Cys Cys Gly Ser			
1	5	10	15
Leu Ala Asp Tyr Leu Thr Ser Ala Lys Phe Leu Leu Tyr Leu Gly His			
20	25	30	
Ser Leu Ser Thr Trp Gly Asp Arg Met Trp His Phe Ala Val Ser Val			
35	40	45	
Phe Leu Val Glu Leu Tyr Gly Asn Ser Leu Leu Leu Thr Ala Val Tyr			
50	55	60	
Gly Leu Val Val Ala Gly Ser Val Leu Val Leu Gly Ala Ile Ile Ser			

65

70

75

80

Asp Trp Val Asp Lys Asn Ala Arg Leu Lys Val Ala Gln Thr Ser Leu  
 85 . . . 90 . . . 95



Val Val Gln Asn Val Ser Val Ile Leu Cys Gly Ile Ile Leu Met Met  
100 105 110

Val Phe Leu His Lys His Glu Leu Leu Thr Met Tyr His Gly Trp Val  
115 . . . . . 120 . . . . . 125

Leu Thr Ser Cys Tyr Ile Leu Ile Ile Thr Ile Ala Asn Ile Ala Asn  
130 135 140

Leu Ala Ser Thr Ala Thr Ala Ile .Thr Ile Gln Arg Asp Trp Ile Val  
145 150 155 160

Val Val Ala Gly Glu Asp Arg Ser Lys Leu Ala Asn Met Asn Ala Thr  
165 . . . . . 170 . . . . . 175

Ile Arg Arg Ile Asp Gln Leu Thr Asn Ile Leu Ala Pro Met Ala.Val  
180 185 . 190

Gly Gln Ile Met Thr Phe Gly Ser Pro Val Ile Gly Cys Gly Phe Ile  
195 200 205

Ser Gly Trp Asn Leu Val Ser Met Cys Val Glu Tyr Val Leu Leu Trp  
210 215 220

Lys Val Tyr Gln Lys Thr Pro Ala Leu Ala Val Lys Ala Gly Leu Lys  
 225                  230                  235                  240

Glu Glu Glu Thr Glu Leu Lys Gln Leu Asn Leu His Lys Asp Thr Glu  
245 250 255

Pro Lys Pro Leu Glu Gly Thr His Leu Met Gly Val Lys Asp Ser Asn  
260 . . 265 . . 270 . .

Ile His Glu Leu Glu His Glu Gln Glu Pro Thr Cys Ala Ser Gln Met  
275 280 285

Ala Glu Pro Phe Arg Thr Phe Arg Asp Gly Trp Val Ser Tyr Tyr Asn

290

295

300

Gln Pro Val Phe Leu Ala Gly Met Gly Leu Ala Phe Leu Tyr Met Thr  
 305                   310                   315                   320

Val Leu Gly Phe Asp Cys Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Tyr Thr Gln Gly  
 325                   330                   335

Leu Ser Gly Ser Ile Leu Ser Ile Leu Met Gly Ala Ser Ala Ile Thr  
 340                   345                   350

Gly Ile Met Gly Thr Val Ala Phe Thr Trp Leu Arg Arg Lys Cys Gly  
 355                   360                   365

Leu Val Arg Thr Gly Leu Ile Ser Gly Leu Ala Gln Leu Ser Cys Leu  
 370                   375                   380

Ile Leu Cys Val Ile Ser Val Phe Met Pro Gly Ser Pro Leu Asp Leu  
 385                   390                   395                   400

Ser Val Ser Pro Phe Glu Asp Ile Arg Ser Arg Phe Ile Gln Gly Glu  
 405                   410                   415

Ser Ile Thr Pro Thr Lys Ile Pro Glu Ile Thr Thr Glu Ile Tyr Met  
 420                   425                   430

Ser Asn Gly Ser Asn Ser Ala Asn Ile Val Pro Glu Thr Ser Pro Glu  
 435                   440                   445

Ser Val Pro Ile Ile Ser Val Ser Leu Leu Phe Ala Gly Val Ile Ala  
 450                   455                   460

Ala Arg Ile Gly Leu Trp Ser Phe Asp Leu Thr Val Thr Gln Leu Leu  
 465                   470                   475                   480

Gln Glu Asn Val Ile Glu Ser Glu Arg Gly Ile Ile Asn Gly Val Gln  
 485                   490                   495

Asn Ser Met Asn Tyr Leu Leu Asp Leu Leu His Phe Ile Met Val Ile  
 500                   505                   510

Leu Ala Pro Asn Pro Glu Ala Phe Gly Leu Leu Val Leu Ile Ser Val

515

520

525

Ser Phe Val Ala Met Gly His Ile Met Tyr Phe Arg Phe Ala Gln Asn  
 530 535 540

Thr Leu Gly Asn Lys Leu Phe Ala Cys Gly Pro Asp Ala Lys Glu Val  
 545 550 555 560

Arg Lys Glu Asn Gln Ala Asn Thr Ser Val Val  
 565 570

<210> 5  
 <211> 1716  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1716)  
 <223> cDNA codificante per una ferroportina mutata in posizione 174 (N1  
 74)

<400> 5  
 atg acc agg gca gat cac aac cgc cag aga gga tgc tgt gga tcc 48  
 Met Thr Arg Ala Gly Asp His Asn Arg Gln Arg Gly Cys Cys Gly Ser  
 1 5 10 15

ttg gcc gac tac ctg acc tct gca aaa ttc ctt ctc tac ctt ggt cat 96  
 Leu Ala Asp Tyr Leu Thr Ser Ala Lys Phe Leu Leu Tyr Leu Gly His  
 20 25 30

tct ctc tct act tgg gga gat cgg atg tgg cac ttt gcg gtg tct gtg 144  
 Ser Leu Ser Thr Trp Gly Asp Arg Met Trp His Phe Ala Val Ser Val  
 35 40 45

ttt ctg gta gag ctc tat gga aac agc ctc ctt ttg aca gca gtc tac 192  
 Phe Leu Val Glu Leu Tyr Gly Asn Ser Leu Leu Thr Ala Val Tyr  
 50 55 60

ggg ctg gtg gca ggg tct gtt ctg gtc ctg gga gcc atc atc ggt 240  
 Gly Leu Val Val Ala Gly Ser Val Leu Val Leu Gly Ala Ile Ile Gly  
 65 70 75 80

gac tgg gtg gac aag aat gct aga ctt aaa gtg gcc cag acc tcg ctg 288  
 Asp Trp Val Asp Lys Asn Ala Arg Leu Lys Val Ala Gln Thr Ser Leu  
 85 90 95

gtg gta cag aat gtt tca gtc atc ctg tgt gga atc atc ctg atg atg 336  
 Val Val Gln Asn Val Ser Val Ile Leu Cys Gly Ile Ile Leu Met Met  
 100 105 110

gtt ttc tta cat aaa cat gag ctt ctg acc atg tac cat gga tgg gtt Val Phe Leu His Lys His Glu Leu Leu Thr Met Tyr His Gly Trp Val 115 120 125	384
ctc act tcc tgc tat atc ctg atc atc act att gca aat att gca aat Leu Thr Ser Cys Tyr Ile Leu Ile Thr Ile Ala Asn Ile Ala Asn. 130 135 140	432
ttg gcc agt act got act gca atc aca atc caa agg gat tgg att gtt Leu Ala Ser Thr Ala Ile Thr Ile Gln Arg Asp Trp Ile Val 145 150 155 160	480
gtt gtt gca gga gaa gac aga agc aaa cta gca aat atg att gcc aca Val Val Ala Gly Glu Asp Arg Ser Lys Leu Ala Asn Met Ile Ala Thr 165 170 175	528
ata cga agg att gac cag tta acc aac atc tta gcc ccc atg gct gtt Ile Arg Arg Ile Asp Gln Leu Thr Asn Ile Leu Ala Pro Met Ala Val 180 185 190	576
ggc cag att atg aca ttt ggc tcc cca gtc atc ggc tgt ggc ttt att Gly Gln Ile Met Thr Phe Gly Ser Pro Val Ile Gly Cys Gly Phe Ile 195 200 205	624
tcg gga tgg aac ttg gta tcc atg tgc gtg gag tac gtc ctg ctc tgg Ser Gly Trp Asn Leu Val Ser Met Cys Val Glu Tyr Val Leu Leu Trp 210 215 220	672
aag gtt tac cag aaa acc cca gct cta gct gtg aaa gct ggt ctt aaa Lys Val Tyr Gln Lys Thr Pro Ala Leu Ala Val Lys Ala Gly Leu Lys 225 230 235 240	720
gaa gag gaa act gaa ttg aaa cag ctg aat tta cac aaa gat act gag Glu Glu Glu Thr Glu Leu Lys Gln Leu Asn Leu His Lys Asp Thr Glu 245 250 255	768
cca aaa ccc ctg gag gga act cat cta atg ggt gtg aaa gac tct aac Pro Lys Pro Leu Glu Gly Thr His Leu Met Gly Val Lys Asp Ser Asn 260 265 270	816
atc cat gag ctt gaa cat gag caa gag cct act tgt gcc tcc cag atg Ile His Glu Leu Glu His Glu Gln Glu Pro Thr Cys Ala Ser Gln Met 275 280 285	864
gct gag ccc ttc cgt acc ttc cga gat gga tgg gtc tcc tac tac aac Ala Glu Pro Phe Arg Thr Phe Arg Asp Gly Trp Val Ser Tyr Tyr Asn 290 295 300	912
cag cct gtg ttt ctg gct ggc atg ggt ctt gct ttc ctt tat atg act Gln Pro Val Phe Leu Ala Gly Met Gly Leu Ala Phe Leu Tyr Met Thr 305 310 315 320	960
gtc ctg ggc ttt gac tgc atc acc aca ggg tac gcc tac act cag gga Val Leu Gly Phe Asp Cys Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Tyr Thr Gln Gly 325 330 335	1008



ctg agt ggt tcc atc ctc agt att ttg atg gga gca tca gct ata act  
Leu Ser Gly Ser Ile Leu Ser Ile Leu Met Gly Ala Ser Ala Ile Thr  
340 345 350

gga ata atg gga act gta gct ttt act tgg cta cgt cga aaa tgt ggt  
Gly Ile Met Gly Thr Val Ala Phe Thr Trp Leu Arg Arg Lys Cys Gly  
355 360 365

ttg gtt cgg aca ggt ctg atc tca gga ttg gca cag ctt tcc tgt ttg  
Leu Val Arg Thr Gly Leu Ile Ser Gly Leu Ala Gln Leu Ser Cys Leu  
.370 375 380

atc ttg tgt gtg atc tct gta ttc atg cct gga agc ccc ctg gac ttg  
Ile Leu Cys Val Ile Ser Val Phe Met Pro Gly Ser Pro Leu Asp Leu  
385 390 395 400

tcc gtt tct cct ttt gaa gat atc cga tca agg ttc att caa gga gag  
Ser Val Ser Pro Phe Glu Asp Ile Arg Ser Arg Phe Ile Gln Gly Glu  
405 410 415

tca att aca cct acc aag ata cct gaa att aca act gaa ata tac atg  
Ser Ile Thr Pro Thr Lys Ile Pro Glu Ile Thr Thr Glu Ile Tyr Met  
420 425 430

tct aat ggg tct aat tct gct aat att gtc ccg gag aca agt cct gaa  
Ser Asn Gly Ser Asn Ser Ala Asn Ile Val Pro Glu Thr Ser Pro Glu  
435 440 445

tct gtg ccc ata atc tct gtc agt ctg ctg ttt gca ggc gtc att gct  
Ser Val Pro Ile Ile Ser Val Ser Leu Leu Phe Ala Gly Val Ile Ala  
450 455 460

gct aga atc ggt ctt tgg tcc ttt gat tta act gtg aca cag ttg ctg.  
Ala Arg Ile Gly Leu Trp Ser Phe Asp Leu Thr Val Thr Gln Leu Leu  
465 470 475 480

caa gaa aat gta att gaa tct gaa aga ggc att ata aat ggt gta cag  
Gln Glu Asn Val Ile Glu Ser Glu Arg Gly Ile Ile Asn Gly Val Gln  
485 490 495

aac tcc atg aac tat ctt ctt gat ctt ctg cat ttc atc atg gtc atc  
Asn Ser Met Asn Tyr Leu Leu Asp Leu Leu His Phe Ile Met Val Ile  
500 505 510

ctg gct cca aat cct gaa gct ttt ggc ttg ctc gta ttg att tca gtc  
Leu Ala Pro Asn Pro Glu Ala Phe Gly Leu Leu Val Leu Ile Ser Val  
515 520 525

tcc ttt gtg gca atg ggc cac att atg tat ttc cga ttt gcc caa aat  
Ser Phe Val Ala Met Gly His Ile Met Tyr Phe Arg Phe Ala Gln Asn  
530 535 540

act ctg gga aac aag ctc ttt gct tgc ggt cct gat gca aaa gaa gtt  
Thr Leu Gly Asn Lys Leu Phe Ala Cys Gly Pro Asp Ala Lys Glu Val  
545 550 555 560

1152

1200

1248

1296

1344

1392

1440

1488

1536

1584

1632

1680

1716

agg aag gaa aat caa gca aat aca tct gtt gtt tga  
 Arg Lys Glu Asn Gln Ala Asn Thr Ser Val Val  
 565                            570

<210> 6  
 <211> 571  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Met Thr Arg Ala Gly Asp His Asn Arg Gln Arg Gly Cys Cys Gly Ser  
 1                            5                            10                            15

Leu Ala Asp Tyr Leu Thr Ser Ala Lys Phe Leu Leu Tyr Leu Gly His  
 20                            25                            30

Ser Leu Ser Thr Trp Gly Asp Arg Met Trp His Phe Ala Val Ser Val  
 35                            40                            45

Phe Leu Val Glu Leu Tyr Gly Asn Ser Leu Leu Leu Thr Ala Val Tyr  
 50                            55                            60

Gly Leu Val Val Ala Gly Ser Val Leu Val Leu Gly Ala Ile Ile Gly  
 65                            70                            75                            80

Asp Trp Val Asp Lys Asn Ala Arg Leu Lys Val Ala Gln Thr Ser Leu  
 85                            90                            95

Val Val Gln Asn Val Ser Val Ile Leu Cys Gly Ile Ile Leu Met Met  
 100                            105                            110

Val Phe Leu His Lys His Glu Leu Leu Thr Met Tyr His Gly Trp Val  
 115                            120                            125

Leu Thr Ser Cys Tyr Ile Leu Ile Thr Ile Ala Asn Ile Ala Asn  
 130                            135                            140

Leu Ala Ser Thr Ala Thr Ala Ile Thr Ile Gln Arg Asp Trp Ile Val  
 145                            150                            155                            160

Val Val Ala Gly Glu Asp Arg Ser Lys Leu Ala Asn Met Ile Ala Thr  
 165                            170                            175

Ile Arg Arg Ile Asp Gln Leu Thr Asn Ile Leu Ala Pro Met Ala Val  
 180 185 190

Gly Gln Ile Met Thr Phe Gly Ser Pro Val Ile Gly Cys Gly Phe Ile  
 195 200 205

Ser Gly Trp Asn Leu Val Ser Met Cys Val Glu Tyr Val Leu Leu Trp  
 210 215 220

Lys Val Tyr Gln Lys Thr Pro Ala Leu Ala Val Lys Ala Gly Leu Lys  
 225 230 235 240

Glu Glu Glu Thr Glu Leu Lys Gln Leu Asn Leu His Lys Asp Thr Glu  
 245 250 255

Pro Lys Pro Leu Glu Gly Thr His Leu Met Gly Val Lys Asp Ser Asn  
 260 265 270

Ile His Glu Leu Glu His Glu Gln Glu Pro Thr Cys Ala Ser Gln Met  
 275 280 285

Ala Glu Pro Phe Arg Thr Phe Arg Asp Gly Trp Val Ser Tyr Tyr Asn  
 290 295 300

Gln Pro Val Phe Leu Ala Gly Met Gly Leu Ala Phe Leu Tyr Met Thr  
 305 310 315 320

Val Leu Gly Phe Asp Cys Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Tyr Thr Gln Gly  
 325 330 335

Leu Ser Gly Ser Ile Leu Ser Ile Leu Met Gly Ala Ser Ala Ile Thr  
 340 345 350

Gly Ile Met Gly Thr Val Ala Phe Thr Trp Leu Arg Arg Lys Cys Gly  
 355 360 365

Leu Val Arg Thr Gly Leu Ile Ser Gly Leu Ala Gln Leu Ser Cys Leu  
 370 375 380

Ile Leu Cys Val Ile Ser Val Phe Met Pro Gly Ser Pro Leu Asp Leu  
 385 390 395 400

Ser Val Ser Pro Phe Glu Asp Ile Arg Ser Arg Phe Ile Gln Gly Glu  
 405                          410                          415

Ser Ile Thr Pro Thr Lys Ile Pro Glu Ile Thr Thr Glu Ile Tyr Met  
 420                          425                          430

Ser Asn Gly Ser Asn Ser Ala Asn Ile Val Pro Glu Thr Ser Pro Glu  
 435                          440                          445

Ser Val Pro Ile Ile Ser Val Ser Leu Leu Phe Ala Gly Val Ile Ala  
 450                          455                          460

Ala Arg Ile Gly Leu Trp Ser Phe Asp Leu Thr Val Thr Gln Leu Leu  
 465                          470                          475                          480

Gln Glu Asn Val Ile Glu Ser Glu Arg Gly Ile Ile Asn Gly Val Gln  
 485                          490                          495

Asn Ser Met Asn Tyr Leu Leu Asp Leu Leu His Phe Ile Met Val Ile  
 500                          505                          510

Leu Ala Pro Asn Pro Glu Ala Phe Gly Leu Leu Val Leu Ile Ser Val  
 515                          520                          525

Ser Phe Val Ala Met Gly His Ile Met Tyr Phe Arg Phe Ala Gln Asn  
 530                          535                          540

Thr Leu Gly Asn Lys Leu Phe Ala Cys Gly Pro Asp Ala Lys Glu Val  
 545                          550                          555                          560

Arg Lys Glu Asn Gln Ala Asn Thr Ser Val Val  
 565                          570

<210> 7  
 <211> 1716  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(1716)  
 <223> cDNA codificante per una ferroportina 1 mutata in posizione 248 (Q248).



<400> 7  
atg acc agg gcg gga gat cac aac cgc cag aga gga tgc tgt gga tcc  
Met Thr Arg Ala Gly Asp His Asn Arg Gln Arg Gly Cys Cys Gly Ser  
1 5 10 15

ttg gcc gac tac ctg acc tct gca aaa ttc ctt ctc tac ctt ggt cat  
Leu Ala Asp Tyr Leu Thr Ser Ala Lys Phe Leu Leu Tyr Leu Gly His  
20 25 30

tct ctc tct act tgg gga gat cgg atg tgg cac ttt gcg gtg tct gtg  
Ser Leu Ser Thr Trp Gly Asp Arg Met Trp His Phe Ala Val Ser Val  
35 40 45

ttt ctg gta gag ctc tat gga aac agc ctc ctt ttg aca gca gtc tac  
Phe Leu Val Glu Leu Tyr Gly Asn Ser Leu Leu Thr Ala Val Tyr  
50 55 60

ggg ctg gtg gtg gca ggg tct gtt ctg gtc ctg gga gcc atc atc ggt  
Gly Leu Val Val Ala Gly Ser Val Leu Val Leu Gly Ala Ile Ile Gly  
65 70 75 80

gac tgg gtg gac aag aat gct aga ctt aaa gtg gcc cag acc tcg ctg  
Asp Trp Val Asp Lys Asn Ala Arg Leu Lys Val Ala Gln Thr Ser Leu  
85 90 95

gtg gta cag aat gtt tca gtc atc ctg tgt gga atc atc ctg atg atg  
Val Val Gln Asn Val Ser Val Ile Leu Cys Gly Ile Ile Leu Met Met  
100 105 110

gtt ttc tta cat aaa cat gag ctt ctg acc atg tac cat gga tgg gtt  
Val Phe Leu His Lys Glu Leu Leu Thr Met Tyr His Gly Trp Val  
115 120 125

ctc act tcc tgc tat atc ctg atc act att gca aat att gca aat  
Leu Thr Ser Cys Tyr Ile Leu Ile Thr Ile Ala Asn Ile Ala Asn  
130 135 140

ttg gcc agt act gct act gca atc aca atc caa agg gat tgg att gtt  
Leu Ala Ser Thr Ala Thr Ile Ile Gln Arg Asp Trp Ile Val  
145 150 155 160

gtt gtt gca gga gaa gac aga agc aaa cta gca aat atg aat gcc aca  
Val Val Ala Gly Glu Asp Arg Ser Lys Leu Ala Asn Met Asn Ala Thr  
165 170 175

ata cga agg att gac cag tta acc aac atc tta gcc ccc atg gct gtt  
Ile Arg Arg Ile Asp Gln Leu Thr Asn Ile Leu Ala Pro Met Ala Val  
180 185 190

ggc cag att atg aca ttt ggc tcc cca gtc atc ggc tgt ggc ttt att  
Gly Gln Ile Met Thr Phe Gly Ser Pro Val Ile Gly Cys Gly Phe Ile  
195 200 205

tcg gga tgg aac ttg gta tcc atg tgc gtg gag tac gtc ctg ctc tgg  
Ser Gly Trp Asn Leu Val Ser Met Cys Val Glu Tyr Val Leu Leu Trp  
210 215 220

96

144

192

240

288

336

384

432

480

528

576

624

672

Janice

aag gtt tac cag aaa acc cca gct cta gct gtg aaa gct ggt ctt aaa Lys Val Tyr Gln Lys Thr Pro Ala Leu Ala Val Lys Ala Gly Leu Lys 225 230 235 240	720
gaa gag gaa act gaa ttg aaa cat ctg aat tta cac aaa gat act gag Glu Glu Glu Thr Glu Leu Lys His Leu Asn Leu His Lys Asp Thr Glu 245 250 255	768
cca aaa ccc ctg gag gga act cat cta atg ggt gtg aaa gac tct aac Pro Lys Pro Leu Glu Gly Thr His Leu Met Gly Val Lys Asp Ser Asn 260 265 270	816
atc cat gag ctt gaa cat gag caa gag cct act tgt gcc tcc cag atg Ile His Glu Leu Glu His Glu Gln Glu Pro Thr Cys Ala Ser Gln Met 275 280 285	864
gct gag ccc ttc cgt acc ttc cga gat gga tgg gtc tcc tac tac aac Ala Glu Pro Phe Arg Thr Phe Arg Asp Gly Trp Val Ser Tyr Tyr Asn 290 295 300	912
cag cct gtg ttt ctg gct ggc atg ggt ctt gct ttc ctt tat atg act Gln Pro Val Phe Leu Ala Gly Met Gly Leu Ala Phe Leu Tyr Met Thr 305 310 315 320	960
gtc ctg ggc ttt gac tgc atc acc aca ggg tac gcc tac act cag gga Val Leu Gly Phe Asp Cys Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Tyr Thr Gln Gly 325 330 335	1008
ctg agt ggt tcc atc ctc agt att ttg atg gga gca tca gct ata act Leu Ser Gly Ser Ile Leu Ser Ile Leu Met Gly Ala Ser Ala Ile Thr 340 345 350	1056
gga ata atg gga act gta gct ttt act tgg cta cgt cga aaa tgt ggt Gly Ile Met Gly Thr Val Ala Phe Thr Trp Leu Arg Arg Lys Cys Gly 355 360 365	1104
ttg gtt cgg aca ggt ctg atc tca gga ttg gca cag ctt tcc tgt ttg Leu Val Arg Thr Gly Leu Ile Ser Gly Leu Ala Gln Leu Ser Cys Leu 370 375 380	1152
atc ttg tgt gtg atc tct gta ttc atg cct gga agc ccc ctg gac ttg Ile Leu Cys Val Ile Ser Val Phe Met Pro Gly Ser Pro Leu Asp Leu 385 390 395 400	1200
tcc gtt tct cct ttt gaa gat atc cga tca agg ttc att caa gga gag Ser Val Ser Pro Phe Glu Asp Ile Arg Ser Arg Phe Ile Gln Gly Glu 405 410 415	1248
tca att aca cct acc aag ata cct gaa att aca act gaa ata tac atg Ser Ile Thr Pro Thr Lys Ile Pro Glu Ile Thr Thr Glu Ile Tyr Met 420 425 430	1296
tct aat ggg tct aat tct gct aat att gtc ccg gag aca agt cct gaa Ser Asn Gly Ser Asn Ser Ala Asn Ile Val Pro Glu Thr Ser Pro Glu 435 440 445	1344

*James J. Ren*

tct gtg ccc ata atc tct gtc agt ctg ctg ttt gca ggc gtc att gct 1392  
 Ser Val Pro Ile Ile Ser Val Ser Leu Leu Phe Ala Gly Val Ile Ala  
 450 455 460

gct aga atc ggt ctt tgg tcc ttt gat tta act gtg aca cag ttg ctg 1440  
 Ala Arg Ile Gly Leu Trp Ser Phe Asp Leu Thr Val Thr Gln Leu Leu  
 465 470 475 480

caa gaa aat gta att gaa tct gaa aga ggc att ata aat ggt gta cag 1488  
 Gln Glu Asn Val Ile Glu Ser Glu Arg Gly Ile Ile Asn Gly Val Gln  
 485 490 495

aac tcc atg aac tat ctt ctt gat ctt ctg cat ttc atc atg gtc atc 1536  
 Asn Ser Met Asn Tyr Leu Leu Asp Leu Leu His Phe Ile Met Val Ile  
 500 505 510

ctg gct cca aat cct gaa gct ttt ggc ttg ctc gta ttg att tca gtc 1584  
 Leu Ala Pro Asn Pro Glu Ala Phe Gly Leu Leu Val Leu Ile Ser Val  
 515 520 525

tcc ttt gtg gca atg ggc cac att atg tat ttc cga ttt gcc caa aat 1632  
 Ser Phe Val Ala Met Gly His Ile Met Tyr Phe Arg Phe Ala Gln Asn  
 530 535 540

act ctg gga aac aag ctc ttt gct tgc ggt cct gat gca aaa gaa gtt 1680  
 Thr Leu Gly Asn Lys Leu Phe Ala Cys Gly Pro Asp Ala Lys Glu Val  
 545 550 555 560

agg aag gaa aat caa gca aat aca tct gtt gtt tga 1716  
 Arg Lys Glu Asn Gln Ala Asn Thr Ser Val Val  
 565 570

<210> 8  
<211> 571  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Thr Arg Ala Gly Asp His Asn Arg Gln Arg Gly Cys Cys Gly Ser  
 1 5 10 15

Leu Ala Asp Tyr Leu Thr Ser Ala Lys Phe Leu Leu Tyr Leu Gly His  
 20 25 30

Ser Leu Ser Thr Trp Gly Asp Arg Met Trp His Phe Ala Val Ser Val  
 35 40 45

Phe Leu Val Glu Leu Tyr Gly Asn Ser Leu Leu Leu Thr Ala Val Tyr  
 50 55 60

Gly Leu Val Val Ala Gly Ser Val Leu Val Leu Gly Ala Ile Ile Gly  
65 70 75 80

Asp Trp Val Asp Lys Asn Ala Arg Leu Lys Val Ala Gln Thr Ser Leu  
85 90 95

Val Val Gln Asn Val Ser Val Ile Leu Cys Gly Ile Ile Leu Met Met  
100 105 110

Val Phe Leu His Lys His Glu Leu Leu Thr Met Tyr His Gly Trp Val  
115 120 125

Leu Thr Ser Cys Tyr Ile Leu Ile Thr Ile Ala Asn Ile Ala Asn  
130 135 140

Leu Ala Ser Thr Ala Thr Ala Ile Thr Ile Gln Arg Asp Trp Ile Val  
145 150 155 160

Val Val Ala Gly Glu Asp Arg Ser Lys Leu Ala Asn Met Asn Ala Thr  
165 170 175

Ile Arg Arg Ile Asp Gln Leu Thr Asn Ile Leu Ala Pro Met Ala Val  
180 185 190

Gly Gln Ile Met Thr Phe Gly Ser Pro Val Ile Gly Cys Gly Phe Ile  
195 200 205

Ser Gly Trp Asn Leu Val Ser Met Cys Val Glu Tyr Val Leu Leu Trp  
210 215 220

Lys Val Tyr Gln Lys Thr Pro Ala Leu Ala Val Lys Ala Gly Leu Lys  
225 230 235 240

Glu Glu Glu Thr Glu Leu Lys His Leu Asn Leu His Lys Asp Thr Glu  
245 250 255

Pro Lys Pro Leu Glu Gly Thr His Leu Met Gly Val Lys Asp Ser Asn  
260 265 270

Ile His Glu Leu Glu His Glu Gln Glu Pro Thr Cys Ala Ser Gln Met  
275 280 285

Ala Glu Pro Phe Arg Thr Phe Arg Asp Gly Trp Val Ser Tyr Tyr Asn  
 290 295 300

Gln Pro Val Phe Leu Ala Gly Met Gly Leu Ala Phe Leu Tyr Met Thr  
 305 310 315 320

Val Leu Gly Phe Asp Cys Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Tyr Thr Gln Gly  
 325 330 335

Leu Ser Gly Ser Ile Leu Ser Ile Leu Met Gly Ala Ser Ala Ile Thr  
 340 345 350

Gly Ile Met Gly Thr Val Ala Phe Thr Trp Leu Arg Arg Lys Cys Gly  
 355 360 365

Leu Val Arg Thr Gly Leu Ile Ser Gly Leu Ala Gln Leu Ser Cys Leu  
 370 375 380

Ile Leu Cys Val Ile Ser Val Phe Met Pro Gly Ser Pro Leu Asp Leu  
 385 390 395 400

Ser Val Ser Pro Phe Glu Asp Ile Arg Ser Arg Phe Ile Gln Gly Glu  
 405 410 415

Ser Ile Thr Pro Thr Lys Ile Pro Glu Ile Thr Thr Glu Ile Tyr Met  
 420 425 430

Ser Asn Gly Ser Asn Ser Ala Asn Ile Val Pro Glu Thr Ser Pro Glu  
 435 440 445

Ser Val Pro Ile Ile Ser Val Ser Leu Leu Phe Ala Gly Val Ile Ala  
 450 455 460

Ala Arg Ile Gly Leu Trp Ser Phe Asp Leu Thr Val Thr Gln Leu Leu  
 465 470 475 480

Gln Glu Asn Val Ile Glu Ser Glu Arg Gly Ile Ile Asn Gly Val Gln  
 485 490 495

Asn Ser Met Asn Tyr Leu Leu Asp Leu Leu His Phe Ile Met Val Ile  
 500 505 510



Leu Ala Pro Asn Pro Glu Ala Phe Gly Leu Leu Val Leu Ile Ser Val  
515 520 525

Ser Phe Val Ala Met Gly His Ile Met Tyr Phe Arg Phe Ala Gln Asn  
530 . . . 535 . . . 540

Thr Leu Gly Asn Lys Leu Phe Ala Cys Gly Pro Asp Ala Lys Glu Val  
 545                550                555                560

Arg Lys Glu Asn Gln Ala Asn Thr Ser Val Val  
565 570

<210> 9  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> polymerase chain reaction primer  
<222> (1)..(20)  
<223> PCR primer. Esone 1 5'

<400> 9  
ggtgctatct ccagttcctt

20

<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> PCR primer. Esone 1 3

<400> 10  
gttcacagca gagccacatt

20

<210> 11  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> *Homo sapiens*

```
<220>
<221> misc_feature
<223> PCR primer esone 2 5'
```

25

<400> 11  
cagctcatta agtgactacc atcgc

<210> 12  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 12  
ggcttaatac aactggctag aacg

24

<210> 13  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> PCR primer. Esone 3' 5'

<400> 13  
cataatgttag ccaggaagtg ccc

23

<210> 14  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> PCR primer. Esone 3' 3'

<400> 14  
tccagaggtg gtgccatcta ag

22

<210> 15  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 15  
gagacatttt gatgtaatgt acac

24

<210> 16  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 16

*fusca fusca*  
24

ctaccagata ttcaatttc tgcc

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 17

ccacccaaaga ctatttaaa ctgc

24

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 18

tcaccaccga tttaaagtga atcc

24

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; PCR primer. Esone 6 5'.

&lt;400&gt; 19

gtattgtgt aatgggcagt ctc

23

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; PCR primer. Esone 6 3'

&lt;400&gt; 20

ccccactggta aataaaacct g

21

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 21

ggcttttatt tctacatgtc ctcc

24



<210> 22  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 22  
 acattttaggg aacatttcag atc

23

<210> 23  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 23  
 aaggtgactt aaagacagtc aggc

24

<210> 24  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 24  
 gctgacttag gtttcctaaa cagc

24

<210> 25  
 <211> 10  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> oligonucleotide comprendente il polimorfismo al nt 238

<400> 25  
 atcaggtaact

10

<210> 26  
 <211> 10  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> oligonucleotide comprendente il polimorfismo al nt 521.

<400> 26  
 gatgattgcc

10

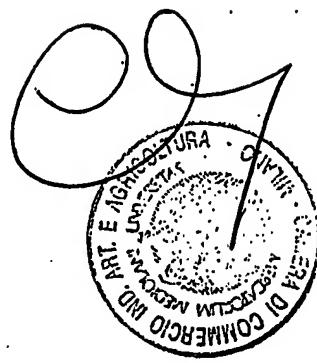
*famili*

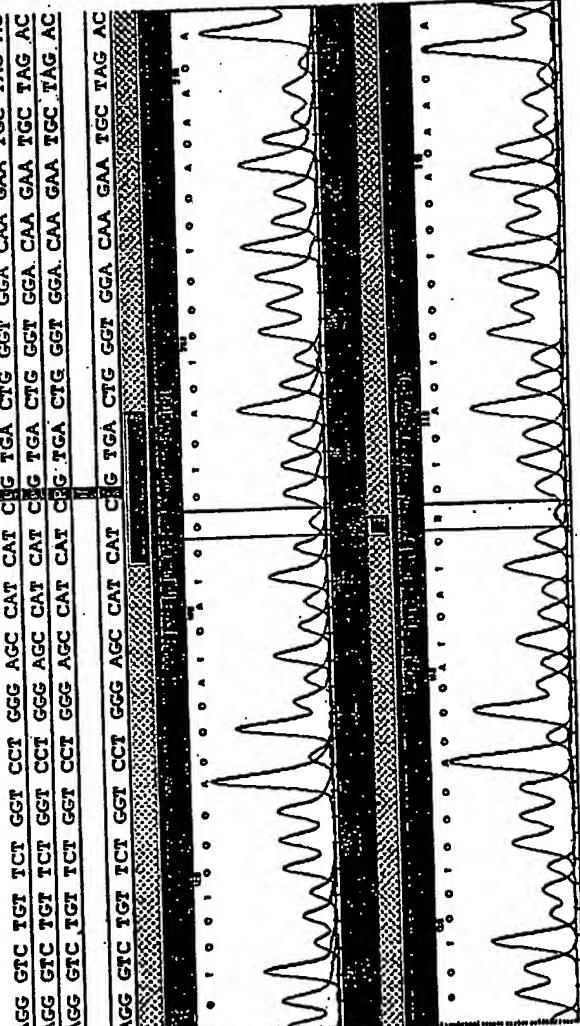
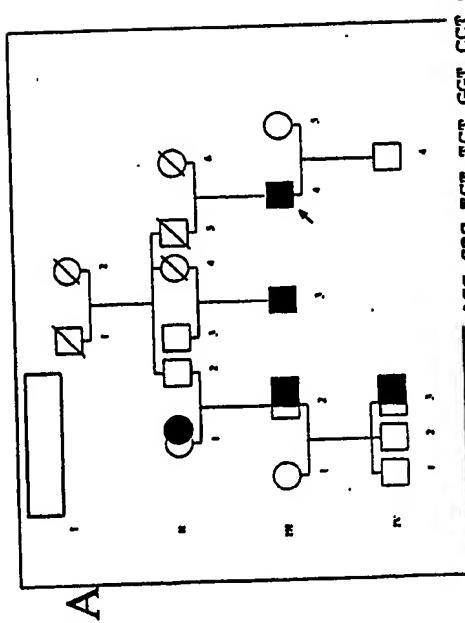
<210> 27  
<211> 10  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> oligonucleotide comprendente il polimorfismo al nt 744

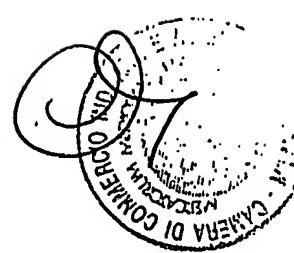
<400> 27  
gaaacatctg

10



*firma firma*

2003 A 0 0 1 1 5 6



NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

*June 1861*

C TTA AAG AGG AAA CTG AAT TGA AAC ACG TGA ATT TAC ACA AAG GTA AAC TGA ACA CAA  
C TTA AAG AGG AAA CTG AAT TGA AAC ACG TGA ATT TAC ACA AAG GTA AAC TGA ACA CAA  
C TTA AAG AGG AAA CTG AAT TGA AAC ATC TGA ATT TAC ACA AAG GTA AAC TGA ACA CAA

C TTA AAG AGG AAA CTG AAT TGA AAC ABC TGA ATT TAC ACA AAG GTA AAC TGA ACA CAA

O A O O A A G T O O A A T I O O A A C A A O O T O O A A P I T A C A A O A O T A A

A vertical decorative border consisting of a series of wavy, horizontal lines.

THE JOURNAL OF CLIMATE

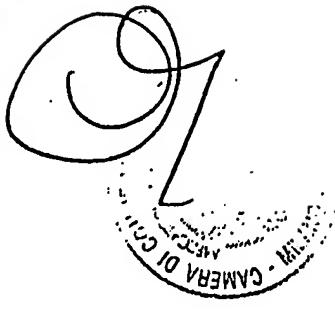
0 A C O O A R O O I O A A T V O P A A G A Y O V O A V V T A C A A A O O I A A

Wavy lines on the right side of the page.

4

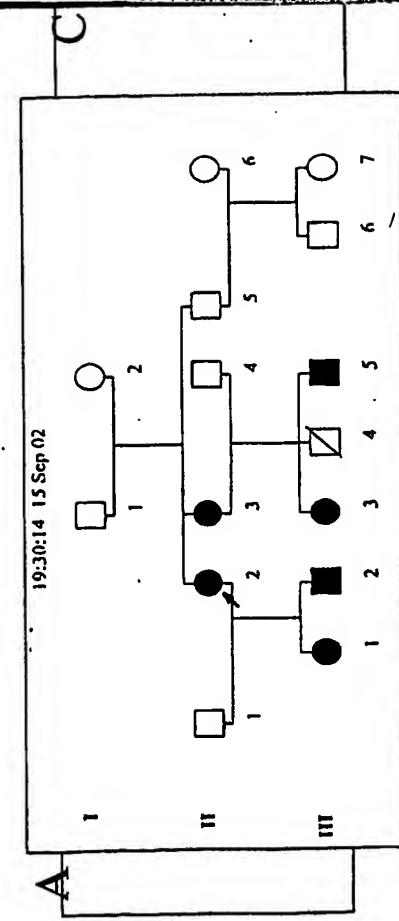
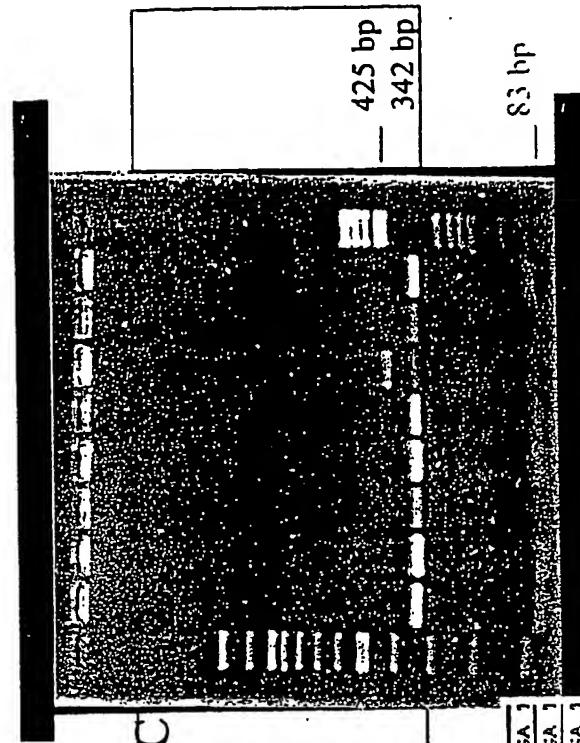
Controllo

Malato



· MI 2003 A 001156

*Franco Torrisi*



CCG CTC TAG ATA TGA ATG CCA CAA TAC GAA GGA 1  
 CCT CTC TAG ATA TGA ATG CCA CAA TAC GAA GGA 1  
 CCT CTC TAG ATA TGA ATG CCA CAA TAC GAA GGA 1

CCC CTC TAG ATA TGA ATG CCA CAA TAC GAA GGA 1  
 CCC CTC TAG ATA TGA ATG CCA CAA TAC GAA GGA 1  
 CCC CTC TAG ATA TGA ATG CCA CAA TAC GAA GGA 1

B

= 2003 A 0 0 1 1 5 6

Controllo

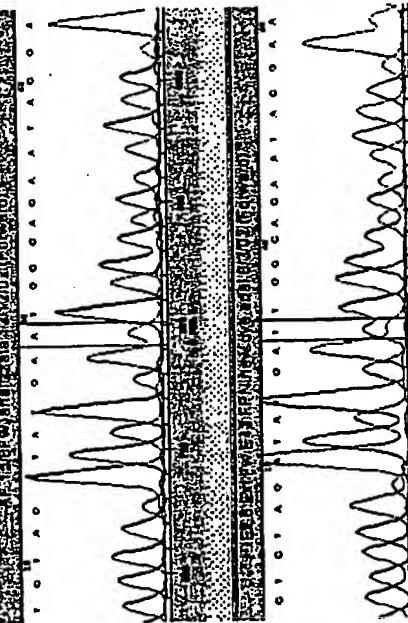
A->T esone 6

Cambio AA 174

Asparagina → Isoleucina

Idrofilico  
Non carico  
PM: 132

Malato



*Scansione 100%*

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**